

Biologisch aktive Analoga der extrazellulären Matrix – künstliche Haut und Nerven

Von Ioannis V. Yannas*

In memoriam Piero Pino

Die Entwicklung von Tieren beginnt mit einer einzigen Zelle, die sich teilt; die neuen Zellen differenzieren zu hochspezifischen Geweben, Organen und Gliedern, und der kleine, aber funktionstüchtige Organismus erreicht irgendwann seine volle Größe. Während dieser Entwicklung durchlaufen auch die extrazellulären Matrices (ECM), d. h. komplexe makromolekulare Netzwerke, drastische Veränderungen. Matrixtransformationen steuern mitunter die viel besser untersuchten Änderungen von Anzahl und Typus der differenzierenden Zellen. ECM-Netzwerke werden meist enzymatisch zu Oligopeptiden abgebaut und danach neu synthetisiert (umgestaltet), wobei sich unlösliche und nicht diffundierende makromolekulare Strukturen bilden, die vielzelligen Systemen ihre Form verleihen. Reife ECM wie Haut, Sehnen, Knorpel und Blutgefäße geben Organen und Geweben Steifheit und Stabilität. Eine Umgestaltung der ECM tritt während der Wundheilung auch in erwachsenen Organismen auf. Der Einsatz von synthetischen ECM-Analoga kann helfen, die Bedeutung der ECM für die Entwicklung oder Wundheilung zu verstehen. Es wurden einfache chemische Analoga synthetisiert, von denen einige eine bemerkenswerte biologische Aktivität aufweisen, darunter eins, das die partielle Regeneration der Haut sowohl bei erwachsenen Meerschweinchen als auch beim Menschen induziert. Mit einem ähnlichen ECM-Analogen wurden auch periphere Nerven regeneriert. Derartige verletzte Hautpartien und Nerven regenerieren sich bei Wirbeltieren nicht spontan. Verfahren zur Herstellung der ECM-Analoga mit maßgeschneiderten physikalisch-chemischen Eigenschaften wie Geschwindigkeit des enzymatischen Abbaus nach Implantation, Porenstruktur und Grad der Collagenkristallinität werden in diesem Aufsatz zusammengefaßt. ECM-Analoga zeigen völlig neue Wege bei der Behandlung von ernsten Organfehlfunktionen und Organverlust. Ein ECM-Analogen ist bereits die Basis einer klinischen Behandlung von Patienten mit starken Brandverletzungen. Eine Interpretation der Ergebnisse führt zu einer Hypothese über die Natur der ECM während der Entwicklung. Da biologische Aktivität nur dann beobachtet wird, wenn die physikalisch-chemischen Parameter innerhalb enger Grenzen liegen, könnte man die ECM als einen unlöslichen Wachstumsfaktor beschreiben, der für die Synthese von Gewebe spezifisch ist. Möglicherweise benötigt jedes Gewebe zur Entwicklung eine eigene ECM.

1. Einleitung

Die meisten Gewebe bestehen aus Zellen und einer größtenteils unlöslichen, nicht diffundierenden extrazellulären Matrix (ECM). Vielzelligen Systemen verleiht die ECM Steifheit und Formstabilität. Obwohl Zusammensetzung und Struktur der ECM von Gewebe zu Gewebe variieren, sind diese Matrices doch typischerweise stark hydratisierte makromolekulare Netzwerke, die zu wechselnden Anteilen aus Glycoproteinen wie Collagen, Elastin, Fibronectin, Laminin und Chondronectin bestehen sowie aus Glycosaminoglycanen (GAG) einschließlich Hyaluronsäure, Chondroitin-6-sulfat, Dermatansulfat und Heparansulfat. GAGs kommen gewöhnlich als Polysaccharidketten vor, die kovalent an einen Proteinkern gebunden sind (Proteoglycan). Die makromolekularen Komponenten der ECM werden in den Zellen synthetisiert und dann in den Extrazellulärraum sekretiert, wo weitere physikalisch-chemische Modifikationen wie Kristallisation und kovalente Vernetzung von makromolekularen Ketten stattfinden^[1, 2].

Die ECM zwischen zwei Zellschichten verschiedenen Ursprungs wird häufig Basallamina oder Basalmembran genannt; sie ist in Abbildung 1^[2-5] dargestellt. Die Basallamina muß eine bedeutende Rolle während der Organisation von Zellen zu funktionellen Einheiten (Morphogenese) spielen, da ihre Entfernung durch selektiven enzymatischen Abbau in Modellen die Morphogenese vollständig unterdrückt^[3]. Während des ganzen Lebens, aber besonders während der Entwicklung, wird die Basallamina während der Gewebeumgestaltung abgebaut, resynthetisiert und weiter abgebaut. Die Umgestaltung der Basallamina ist auch während der Wundheilung ein sehr aktiver Prozeß^[4]. An all diesen Vorgängen sind enge und wahrscheinlich iterative Wechselwirkungen zwischen Zellen und Matrix beteiligt. Diese spezifischen Wechselwirkungen werden derzeit intensiv untersucht^[1, 2, 5]. Trotz wichtiger neuer Erkenntnisse sind die genauen molekularen Mechanismen, die den kritischen Zell-Matrix- oder Zell-Zell-Wechselwirkungen während der Entwicklung zugrundeliegen, immer noch unbekannt^[3, 6], was teilweise daran liegt, daß keine gut definierten, biologisch aktiven Matrices für Untersuchungen zur Verfügung stehen^[6].

Chemische Analoga der ECM bieten einen neuen Ansatz, um die komplexen Vorgänge während der Entwicklung zu verstehen. Die bisher synthetisierten Analoga sind Pflropfco-

[*] Prof. I. V. Yannas
Department of Mechanical Engineering,
Massachusetts Institute of Technology
Cambridge, MA 02139 (USA)

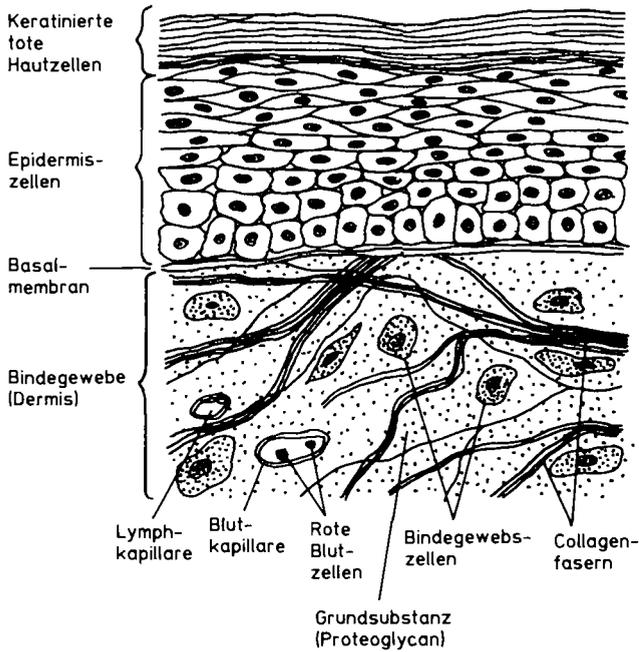


Abb. 1. Dieser schematische Schnitt durch die Haut zeigt die Lage der Basalmembran zwischen der zellulären Epidermis und der größtenteils nicht zellulären Dermis. Die Basalmembran ist eine extrazelluläre Matrix, die typischerweise an der Grenzfläche zwischen verschiedenen Geweben vorkommt. Der Terminus Basalmembran wird oft gleichbedeutend mit Basallamina benutzt; manche Autoren unterscheiden jedoch zwischen beiden Ausdrücken und beschreiben damit eine größere bzw. kleinere Anzahl von Schichten der Grenzflächenmatrix (nach [97]).

polymere aus Kollagen und jeweils einem von vielen Glycosaminoglycanen; sie sind sehr einfache Modelle der chemisch komplexen ECMs. Dennoch wurden durch sorgfältige Steuerung der Vernetzungsdichte hochmolekulare Netzwerke hergestellt, die unter dem Einfluß von Gewebezymen in einem Zeitraum von Tagen bis Wochen abgebaut werden. Die Lebensdauer der ECM während der Entwicklung und der Wundheilung kann beliebig eingestellt werden, so daß man ihre Auswirkung auf Zell-Matrix- und Zell-Zell-Wechselwirkungen untersuchen kann. Ferner können Gele mit sehr unterschiedlicher Hydratation und spezifischer Oberfläche durch Steuerung des Porenvolumens und des durchschnittlichen Porendurchmessers hergestellt werden. Da bestimmte Zelltypen sehr eng mit der Oberfläche dieser ECM-Analoga wechselwirken, bietet sich die Gelegenheit, Systeme zu untersuchen, in denen die Dichte der mit der Matrix in Wechselwirkung stehenden Zellen stark variiert.



Ioannis V. Yannas begann sein Chemiestudium am Harvard College, Cambridge, MA (BA 1957). Anschließend studierte er Chemieingenieurwesen am Massachusetts Institute of Technology (MIT), Cambridge (MS 1959), und Physikalische Chemie an der Princeton University, Princeton, NJ (MS 1965, PhD 1966). Seit 1966 hält er am MIT Vorlesungen über Polymere und besonders über physikalische Eigenschaften biologischer Polymere. Sein Arbeitsgebiet umfaßt die Entwicklung medizinischer Hilfsmittel aus natürlichen Polymeren, z. B. künstliche Haut und Nerven. Sein derzeitiges Spezialgebiet ist die Synthese physikalisch-chemischer Analoga der extrazellulären Matrix zur Untersuchung der Geweberegeneration bei Säugetieren. Prof. Yannas ist Autor oder Coautor von über 130 Veröffentlichungen und Inhaber von zehn Patenten. Er wurde zum Mitglied des Institute of Medicine der National Academy of Sciences (USA) gewählt. Für die Synthese von künstlicher Haut ist er von der American Chemical Society, der Society for Biomaterials und der Society of Plastics Engineers ausgezeichnet worden.

Der Hauptbestandteil der chemischen Analoga der ECM ist Kollagen, ein Faserprotein, das etwa ein Drittel des Gesamtproteins in Wirbeltieren ausmacht. Die ungewöhnliche Aminosäurezusammensetzung und ein charakteristisches Röntgenbeugungsmuster unterscheiden Kollagen deutlich von anderen Gewebestandteilen^[1, 7].

Abbildung 2 zeigt die verschiedenen Organisationsebenen des Kollagens. Kollagen kann relativ rein aus Bindegeweben wie Rinderhaut und -sehnen extrahiert werden und in verdünnter Essigsäure oder anderen Lösungsmitteln entweder in Form von tripelhelicalen Makromolekülen oder als Partikelsuspension von natürlich quervernetzten Aggregaten solcher Makromoleküle in Lösung gebracht werden. Festes Kollagen erhält man durch Verdampfen des Lösungsmittels oder Fällen aus der Lösung. Auf diese Weise rekonstituiertes Kollagen kann zu Membranen (Filmen), Röhren, Fasern oder Bändern geformt werden. Kollagen ist in Form von rekonstituierten Membranen oder Nahtmaterial schon seit mindestens 1943 von verschiedenen Arbeitsgruppen implantiert worden^[8-12]; die Wechselwirkung zwischen zufällig rekonstituiertem Kollagen und dem Wirtsgewebe ist jedoch passiv und führt größtenteils zum Abbau der Kollagentripelhelices durch Kollagenasen, die von Zellen sekretiert werden, die dem Implantat benachbart sind.

Im Gegensatz zu den zufällig rekonstituierten Kollagenen wechselwirken die in diesem Aufsatz behandelten Kollagenanaloga der ECM hochspezifisch mit Zellen, die aus dem angrenzenden Gewebe in die Implantate einwandern. Der Begriff Regenerationstemplat oder einfach Templat wurde für diese biologisch aktiven Formen des Kollagens eingeführt^[13]. Template haben die Fähigkeit, eine Geweberegeneration in einer gut definierten Tierverletzung zu induzieren, bei der sich das Gewebe nicht spontan regeneriert. Mindestens fünf Eigenschaften unterscheiden Template von biologisch inaktivem Kollagen: die chemischen Zusammensetzung des makromolekularen Netzwerkes (Verhältnis Kollagen/GAG), die Vernetzungsdichte zwischen den Makromolekülen, der durchschnittliche Porendurchmesser (1–1000 µm), die Kollagenfraktion, die in hochkristalliner (gebänderter) Form vorliegt, und der Volumenanteil an Wasser. Die ersten drei dieser Parameter sind recht gründlich untersucht worden. Zusätzlich können Template vor der Implantation mit Zellen präpariert werden, wodurch ihre biologische Aktivität genau so stark beeinflusst wird wie durch physikalisch-chemische Manipulationen.

Gewebe, Organe und Glieder werden bei den einzelnen Spezies recht unterschiedlich regeneriert. Amphibien wie

Ratte nicht hinreichend, um 15 mm lange Lücken zwischen zwei Stümpfen zu überbrücken. Statt dessen wird nichtphysiologisches Gewebe (Neuroma) an beiden Stumpfenden synthetisiert^[19, 20].

Die hier diskutierten molekularen Matrices beeinflussen stark die Kinetik und den Mechanismus der Wundheilung bei bestimmten Säugetierspezies und beim Menschen. Eine dieser Matrices unterdrückt die Narbenbildung und induziert eine nahezu totale Synthese der Dermis von Meerschweinchen und Mensch. Eine ähnliche Matrix induziert die Regeneration des Ischiasnervs in der Ratte über eine Lücke von 15 mm. Beide Male sind es Copolymere, die durch chemisches Aufpfropfen von Chondroitin-5-sulfat-Ketten auf Collagenfasern hergestellt wurden. Der IUPAC-Nomenklatur^[21] gemäß werden diese Polymere als *Collagen-graft-chondroitin-6-sulfat-Copolymere* bezeichnet oder unter dem Oberbegriff *Collagen-graft-glycosaminoglycan-Copolymere*, kurz CG-Copolymere, zusammengefaßt. Da die biologische Aktivität von ihrer Ultrastruktur abhängt, werden wir den Begriff Copolymer-Matrix benutzen, um das poröse, hydratisierte, unlösliche Gel zu beschreiben, das durch die Bearbeitung des Copolymers entsteht. Der Begriff Implantat bezeichnet das sterile Material, das man in die Wunde bringt.

In diesem Aufsatz sollen die Zusammenhänge zwischen physikalisch-chemischen Eigenschaften von CG-Copolymer-Matrices und den Ergebnissen der biologischen Assays, soweit sie die Regeneration direkt oder indirekt betreffen, dargelegt werden. Es wird gezeigt, daß nur sehr wenige Copolymer-Matrices mit eng definierter Struktur bei der Morphogenese aktive Analoga der ECM sind. Einige Implikationen solcher Analoga für die Untersuchung von Entwicklungsvorgängen und die experimentelle Behandlung von Gewebeerlusten werden kurz besprochen.

2. Synthese von Collagen-GAG-Pfropfcopolymeren

Regenerationstemplate basieren auf Collagen-GAG-Copolymeren. Glycosaminoglycane, die auf Collagen aufgefropft wurden, schließen Chondroitin-6-sulfat, Chondroitin-4-sulfat, Heparansulfat, Heparin, Dermatansulfat und Keratansulfat ein^[21, 22]. Von diesen wurde Chondroitin-6-sulfat am umfassendsten untersucht, und die hier präsentierten Daten beziehen sich auf *Collagen-graft-chondroitin-6-sulfat-Copolymere*. Es gibt aber keinen Hinweis darauf, daß nur dieser Typ biologisch aktiv ist – vielmehr wurden dieses GAG und Typ-I-Collagen aus Rinderhaut in den frühen siebziger Jahren, als die Copolymere zuerst synthetisiert wurden, ausgewählt, weil sie in ausreichenden Mengen erhältlich waren^[22].

Die Basallamina, jene ECM, deren biologische Aktivität durch Collagen-GAG-Templates imitiert wird, besteht hauptsächlich aus den folgenden makromolekularen Komponenten^[23–27]: a) aus Collagen-Typ-IV mit seiner einzigartigen Aminosäurezusammensetzung, einer hochflexiblen makromolekularen Verbindung mit nur geringem Tripelhelixanteil und einer Ultrastruktur, die nicht aus collagentypischen Fibrillen besteht, sondern an ein fadenförmiges offenes Netzwerk oder eine Leiter erinnert^[24, 25, 27], b) aus den Glycoproteinen Laminin, Entactin und Fibronectin und c) aus

Heparansulfat, einem GAG, das Teil eines Proteoglycans ist^[24, 26]. Zukünftige Untersuchungen von Entwicklungsprozessen könnten von der Synthese chemischer Analoga der Basalmembran ausgehen, die in der Zusammensetzung diesem spezialisierten Gewebe sehr ähneln.

Es hat sich gezeigt, daß die chemisch weit einfacheren Collagen-GAG-Copolymere eine deutliche und anscheinend beispiellose Regeneration von Dermis und peripheren Nerven induzieren. Die Wahl dieses einfachen, wenn auch sehr groben Modells für die natürlich vorkommende ECM ermöglichte es, sich den *physikalischen* Aspekten der Matrixstruktur zuzuwenden. Besonders die Porenstruktur, die Struktur des makromolekularen Netzwerks und die kristallinen Anteile wurden variiert und als essentiell für die beobachtete biologische Aktivität der Template erkannt.

GAG-Ketten werden auf Collagen aufgefropft, indem ein Copräzipitat von Collagen und GAG unter Bedingungen behandelt wird, die die Bildung von kovalenten Bindungen zwischen zwei Makromolekülen begünstigen. Zur Copräzipitation sind Sulfatgruppen am GAG erforderlich (Hyaluronsäure ist daher ungeeignet) sowie ein saurer pH-Wert^[28]. Die in wäßriger Essigsäure gebildeten Präzipitate lösen sich jedoch schnell, wenn sich der pH-Wert dem Neutralpunkt nähert^[28], da sie aus ionischen Komplexen bestehen, die durch Wechselwirkung zwischen den anionischen Gruppen des GAGs und den im Sauren positiv geladenen Aminogruppen des Collagens gebildet werden^[28–30].

Collagen-GAG-Copräzipitate können ohne chemische Vernetzungsagentien einfach durch drastische Dehydratation unlöslich gemacht werden, da Collagen bei einem Restwassergehalt von unter 1 Gew.-% unlöslich wird; Gelatine, d. h. vollkommen amorphes Collagen, wird auch erst durch drastische Dehydratation unlöslich^[31, 32]. Die Art der Vernetzung kann aus früheren unabhängigen Untersuchungen von chemisch modifizierten Gelatinen gefolgert werden. Gelatine, die entweder durch Veresterung der Carboxylgruppen, der Aspartyl-/Glutamylreste oder durch Acetylierung der ϵ -Aminogruppen der Lysylreste modifiziert wird, bleibt in wäßrigen Lösungsmitteln löslich, nachdem sie als Feststoff hohen Temperaturen ausgesetzt worden ist, während nicht modifizierte Gelatine ihre Löslichkeit verliert^[33]. Die Unlöslichkeit von Collagen und Gelatine nach gründlicher Dehydratation wurde als das Ergebnis einer drastischen Entfernung des wäßrigen Produkts einer Kondensation verstanden, die zur Bildung von Amidbindungen zwischen den Ketten führt^[31]. Der vorgeschlagene Mechanismus stimmt mit den durch Titration gewonnenen Ergebnissen überein: Die Zahl der freien Carboxyl- und Aminogruppen im Collagen reduziert sich nach Behandlung mit hohen Temperaturen signifikant^[34, 35].

Eine Dehydratation bis zu einer Vernetzungsdichte von über 10^{-5} mol Vernetzungsstellen/g trockener Gelatine, das einem durchschnittlichen Molekulargewicht M_c zwischen den Vernetzungsstellen von etwa 70 kDa entspricht, läßt sich innerhalb von Stunden durch Temperaturen $> 105^\circ\text{C}$ bei Normaldruck erreichen^[36]. Die Möglichkeit, daß die Vernetzung unter diesen Umständen durch eine pyrolytische Reaktion verursacht wird, konnte aufgrund kalorimetrischer Daten ausgeschlossen werden^[37]. Ferner zeigten chromatographische Daten, daß die Aminosäurezusammensetzung des Collagens auch nach einer mehrtägigen Behandlung bei 105°C unverändert bleibt^[38, 39]. Gelatine kann

sogar bei 25 °C vernetzt werden, vorausgesetzt, daß man durch genügend starkes Vakuum die Feuchtigkeit wirksam entfernt, wodurch die Reaktion forciert wird^[31].

Ab 37 °C schmilzt bekanntlich die Tripelhelixstruktur von hoch hydratisiertem Collagen reversibel^[40]. Der Schmelzpunkt steigt mit dem Collagen-Lösungsmittel-Verhältnis von 37 °C (Übergang von der Tripelhelix- zur Einfachstrangform bei einer unendlich verdünnten Lösung) über ca. 120 °C (Collagen mit 20 Gew.-% Lösungsmittel^[40]) bis auf ca. 210 °C (Schmelzpunkt für nicht hydratisiertes Collagen^[32]). Es ist daher möglich, Collagen durch die oben beschriebenen Dehydrationsverfahren quervernetzen, ohne die Tripelhelixstruktur zu verändern. Man muß nur den Feuchtigkeitsgehalt des Collagens auf ein hinreichend niedriges Niveau bringen, damit das Schmelzen vor dem Einsatz der für die rapide Dehydratation nötigen hohen Temperaturen verhindert wird. Die Erhaltung der Tripelhelixstruktur von festem, nicht hydratisiertem Collagen, das längere Zeit 105 °C ausgesetzt war, wurde durch Weitwinkel-Röntgenbeugung, IR-Spektroskopie und Messung der Bestandteile des optisch aktiven Tensors bestätigt^[32, 38].

Durch diese einfache, selbstvernetzende Behandlung können auch GAG-Ketten mit Collagenen vernetzt werden^[41]. Abbildung 3 zeigt die Kinetik dieser Reaktion. Wahrschein-

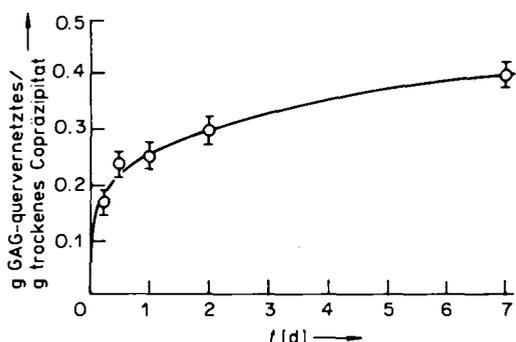
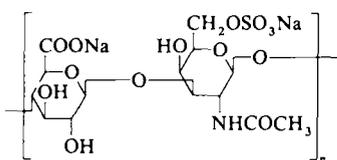


Abb. 3. Kinetik der Quervernetzung von Chondroitin-6-sulfat, einem Glycosaminoglycan, mit Collagen nach Erwärmung auf 105 °C bei 6.7 Pa (50 mtorr). Das Netzwerk entsteht höchstwahrscheinlich durch eine Amidkondensation zwischen den Ketten, an der die ε-Aminogruppen der Lysylreste der Collagenketten und die Carboxygruppen der Glucuronsäurereste in benachbarten GAG-Ketten beteiligt sind (nach [41]).

lich kondensieren die Aminogruppen des Collagens mit den Carboxygruppen der Glucuronsäurereste in den Wiederholungseinheiten des Chondroitin-6-sulfats, eines alternierenden Copolymers aus D-Glucuronsäure und einem O-Sulfatderivat von N-Acetyl-D-Galactosamin (Schema 1)^[28].

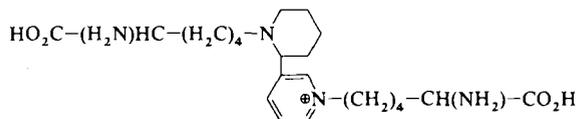


Schema 1. Natriumchondroitin-6-sulfat.

Durch Dehydratation werden 40% des ursprünglich mitgefällten GAGs mit Collagen vernetzt. Mindestens 10 Gew.-% GAG (bezogen auf trockenes Copolymer) kön-

nen kovalent an Collagen gebunden werden, und M_c kann von 2.5–25 kDa variiert werden^[41]. Als Beweis für die Bildung eines makroskopischen Netzwerkes dient der Befund, daß es unmöglich ist, GAG aus dem Produkt unter Bedingungen (Temperatur, Ionenstärke) zu extrahieren, unter denen GAG schnell und quantitativ vom Copräzipitat getrennt werden kann^[41]. Andere Beweise für die kovalente Vernetzung sind die Gleichgewichtszugkraft des Netzwerkes unter Bedingungen, bei denen es sich als ideales Gummi verhält, und das Gleichgewichtsquellungsverhalten (siehe unten)^[41].

Schon seit langem sind Dialdehyde (hauptsächlich Glutaraldehyd) in der Lederindustrie als wirksame Gerbstoffe^[42, 43] und bei Histologen als nützliche Fixative bekannt^[44]. Beide Anwendungen basieren auf der Reaktion zwischen dem Dialdehyd und den ε-Aminogruppen der Lysylreste im Protein, wodurch Quervernetzungen entstehen^[45–47]. Die Natur der Vernetzung ist umstritten, hauptsächlich wegen des komplexen, anscheinend polymeren Charakters des Glutaraldehyds. Einiges spricht für die vorgeschlagene Anabylisinstruktur aus zwei Lysinseitenketten und zwei Molekülen Glutaraldehyd (Schema 2)^[47]. Es gibt jedoch auch Hinweise auf



Schema 2.

andere Mechanismen^[48]. Im Vergleich zu anderen Aldehyden erwies sich Glutaraldehyd als besonders wirksames Vernetzungsmittel^[42, 43] – beispielsweise bewirkt es ein niedriges durchschnittliches Molekulargewicht M_c zwischen den Vernetzungsstellen^[49].

Durch Variation der M_c -Werte erhält man Implantate, die je nach Bedarf innerhalb weniger Tage oder mehrerer Wochen aus dem Gewebe enzymatisch vollständig abgebaut werden. Solche experimentelle Flexibilität ist nötig, um herauszufinden, ob eine Schwellenabbaugeschwindigkeit existiert, unterhalb derer das Implantat biologische Aktivität zeigt. Ein Scannen ist besonders dann nützlich, wenn z. B. Wunden einer neuen Tierart oder eine Wunde an einer neuen Gewebeart bei einer gegebenen Spezies untersucht werden sollen.

Wird Collagen-GAG-Coprazipitat zu wäßrigem Glutaraldehyd in einem neutralen Medium gegeben, so wird der ionische makromolekulare Komplex destabilisiert, und die Ausbeute an Pfropfcopolymer ist dementsprechend gering^[41]. Diesen Befund erhält man auch, wenn die Ionenstärke des wäßrigen Mediums ca. 0.25 M überschreitet^[41]. Bis zu 3 Gew.-% GAG (bezogen auf trockenes Copolymer) können bei pH 3 und physiologischen Ionenstärken (0.15 M) inkorporiert werden. Durch Variation der Collagenquelle, der Glutaraldehydkonzentration und der Reaktionszeit können Netzwerke mit M_c -Werten zwischen 5 und 40 kDa hergestellt werden^[41].

Während der Mechanismus der Reaktion zwischen Glutaraldehyd und Collagen bei neutralem pH-Wert zum Teil aufgeklärt wurde, ist die Reaktion im sauren Medium noch nicht detailliert untersucht worden. Kovalente Bindungen

spielen zweifelsfrei eine Rolle, da Gelatinefilme aus Collagen, das vorher mit Glutaraldehyd umgesetzt wurde, eine fast unbegrenzte Gleichgewichtskraft aushalten, wenn sie in 1 M NaCl-Lösung bei 70 °C gedehnt werden^[41, 49]; im Gegensatz dazu löst sich Gelatine aus unbehandeltem Collagen sehr leicht im heißen Medium. Ähnlich wenig ist darüber bekannt, auf welche Weise GAG-Ketten nach Behandlung des Copräzipitats mit Glutaraldehyd an Collagen gebunden werden. Ein Gelatine-GAG-Komplex aus einem Collagen-GAG-Coprazipitat, das mit Glutaraldehyd in wäßriger, saurer Lösung behandelt wurde, widersteht einer Elution des gebundenen GAGs unter Bedingungen (3 h Immersion in 1 M NaCl bei 70 °C), bei denen sich unbehandelte Gelatine von gebundenem GAG innerhalb von Sekunden trennt^[41]. Daß mit Glutaraldehyd behandelte Collagen-GAG-Coprazipitate als kovalent verbundene Netzwerke vorliegen, zeigt auch die Tatsache, daß sie in gelatinisiertem Zustand Gleichgewichtszugkräfte aushalten^[41].

Heute werden zur Herstellung von Collagen-GAG-Copolymeren entsprechend den Anforderungen an biologisch aktive Implantate sowohl die drastische Dehydratation als auch die Behandlung mit Glutaraldehyd eingesetzt. Die Dehydratation des hochporösen Feststoffes durch Gefrier-trocknung (siehe unten) versteift das schaumige Coprazipitat durch Vernetzen und verhindert dadurch den Porenkollaps bei längerer Einwirkung der umgebenden Feuchtigkeit auf den Schaum. Ein Porenkollaps führt irreversibel zum Verlust der hochspezifischen Oberfläche des Implantats und zugleich zum totalen Verlust der biologischen Aktivität. Die drastische Dehydratation und die Reaktion mit Glutaraldehyd, die beide die Proteinquervernetzung fördern, sterilisieren zudem das Copolymer vor der Implantation^[41]. Nach beiden Verfahren wurden medizinische Präparationen hergestellt (künstliche Haut oder künstliche Dermis genannt), mit denen bereits über 100 Patienten mit schweren Verbrennungen erfolgreich behandelt wurden, ohne daß sich klinisch Hinweise auf Toxizität ergeben hätten^[50, 51]. Die Dehydratationsvernetzung, d.h. eine Selbstvernetzung, macht die Implantate offensichtlich nicht toxisch. Dagegen ist Glutaraldehyd toxisch, und alles, was damit in Berührung kommt, muß vor Gebrauch gut gespült werden. Als zusätzliche Maßnahme wird das Implantat gelegentlich in Medien aufbewahrt, die mit Glutaraldehydrückständen reagieren^[49].

3. Physikalisch-chemische Bearbeitung und Charakterisierung der Copolymermatrices

Die chemische Identität der Collagen-GAG-Copolymere ist für ihre biologische Aktivität wichtig, aber nicht ausreichend: Außer von der chemischen Zusammensetzung und der Vernetzungsdichte hängt die biologische Aktivität stark vom Ausmaß der Copolymerkristallinität und von der Porenstruktur dieser Matrices ab.

Es ist interessant, physikalisch-chemische Methoden zur Herstellung und Charakterisierung von Feststoffen zu entwickeln, die primär nichtkristallin sind und daher nicht durch Röntgenkristallographie analysiert werden können. Wenn sie sich ferner in keinem Lösungsmittel lösen, können sie auch nicht durch Messung kolligativer Eigenschaften in unendlicher Verdünnung charakterisiert werden. Zudem lie-

gen sie in physikalisch heterogenen (porösen) Zuständen vor, die nicht vollständig definiert sind, es sei denn, das Ausmaß der Heterogenität und die spezifische Oberfläche werden genau beschrieben.

Quervernetzte Collagen-GAG-Copolymere können durch Methoden analysiert werden, die auf der „Theorie der Gummielastizität“ basieren. Wenn gezeigt werden kann, daß die von einem Gummi erzeugte Gleichgewichtskraft fast ausschließlich entropisch ist und daß energetische Wechselwirkungen daher vernachlässigt werden können, so kann die Vernetzungsdichte des Netzwerkes durch Messung des Elastizitätsmoduls direkt errechnet werden^[52]. Collagenproben mit hohem Kristallinitätsanteil wie Filme, die bei Raumtemperatur aus einem neutralen Puffer oder natürlich vorkommenden Sehnenfasern gegossen werden, müssen zu Gelatine umgewandelt werden, bevor sie gummielastisch werden^[53]. Unlösliches Collagen, das durch einstündige Immersion in physiologischen Salzlösungen bei 65 bis 80 °C zu Gelatine umgewandelt wurde, weist einen Widerstand gegen uniaxiale Dehnung auf (Elastizitätsmodul), der zur Vernetzungsdichte c (mol Vernetzungen/g trockenes Polymer) direkt proportional ist und zu M_c umgekehrt proportional^[41, 49, 53]. Collagen-GAG-Copolymere verhalten sich ähnlich, wenn das Collagen während der Messung in einem gelatinisierten Zustand gehalten wird^[41, 49]. Diese Beziehungen zeigen, daß – im Gegensatz zu Collagen – gequollene Gelatine ein Netzwerk bildet, in dem die Ketten statistisch geknäuel vorliegen^[54]. Unterhalb ca. 65 °C rekristallisiert die Gelatine, wobei starke energetische Wechselwirkungen entstehen und die oben genannten Beziehungen nicht mehr zutreffen^[49]. Im Anwendungsbereich des idealen gummiähnlichen Modells beschreibt die konstitutive Beziehung (1)^[52, 55] das Elastizitätsverhalten von angemessen gelatinisiertem Collagen^[53] und Collagen-GAG-Copolymeren^[41, 49].

$$\sigma = (\rho RT/M_c)V_2^{1/3}(\alpha - 1/\alpha^2) \quad (1)$$

In Gleichung (1) bedeutet σ die von einer gequollenen Probe ausgehaltene Gleichgewichtszugspannung [Nm^{-2}], α bezeichnet die Länge der gedehnten Probe geteilt durch die Länge der ungedehnten Probe (Dehnungsquotient), V_2 ist der Volumenanteil und ρ die Dichte des trockenen Proteins. Aus Gleichung (1) folgt, daß eine Probe sich wie ein ideales Gummi verhält, wenn die Auftragung von σ gegen die Spannungsfunktion $(\alpha - 1/\alpha^2)$ eine Gerade durch den Koordinatenursprung ergibt und wenn bei konstantem Dehnungsquotient σ und die absolute Temperatur direkt proportional zueinander sind.

Wenn eine Probe kleiner als 1 cm ist, dann wird es unpraktisch, Dehnungsmessungen anzustellen, um die Netzwerkstruktur zu untersuchen. In solchen Fällen kann das Quellverhalten zur Berechnung von M_c herangezogen werden. Diese Methode beruht auf der Theorie von Flory und Rehner^[55, 56], die zeigten, daß der Volumenanteil eines gequollenen Polymers V_2 von M_c abhängt, wie in Gleichung (2) angegeben.

$$\ln(1 - V_2) + V_2 + \chi V_2 - (\rho V_{\text{mol1}}/M_c)(V_2^{1/3} - V_2/2) = 0 \quad (2)$$

V_{mol1} ist das Molvolumen des Lösungsmittels, ρ die Dichte des Polymers und χ die Konstante, die für ein spezifisches Polymer/Lösungsmittelpaar bei einer bestimmten Tempera-

tur charakteristisch ist. Zwar wurden unabhängige Methoden zur Bestimmung von χ beschrieben^[55], es ist aber möglich, M_c aus Dehnungsmessungen eines gegebenen Polymer/Lösungsmittelsystems zu erhalten und damit einen einzigen Wert χ für eine große Zahl von Netzwerkvarianten, die aus demselben Polymer oder Copolymer hergestellt werden können, zu berechnen. Gleichung (2) gilt für Bedingungen, unter denen sich das Netzwerk wie ein ideales Gummi verhält. Abbildung 4 zeigt die Anwendung von Gleichung (2). Die

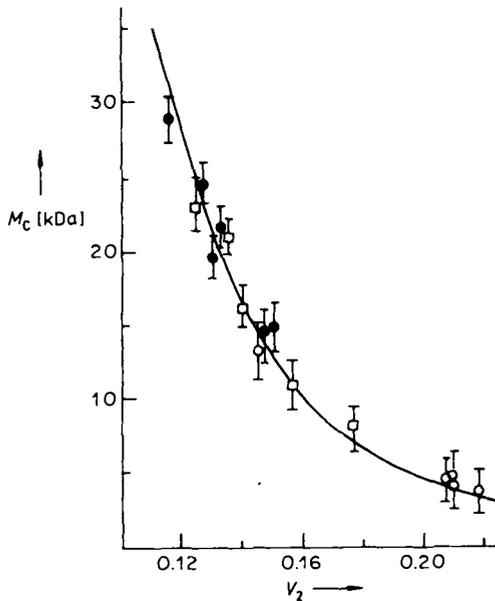


Abb. 4. Beziehung zwischen dem mittleren Molekulargewicht zwischen den Vernetzungsstellen, M_c , und dem Volumenanteil von gelatinisiertem Collagen V_2 . Das Quellmittel ist 0.19 M Zitronensäure/Phosphatpuffer-Lösung (pH 7.4 bei 80 °C). Experimentelle Daten nach Vernetzung mit mehreren Aldehyden: ● Formaldehyd, ○ Glutaraldehyd; □ Glyoxal. Nach Gleichung (2) folgt $\chi = 0.52 \pm 0.04$ (nach [49]).

mit Hilfe der Gleichungen (1) und (2) berechneten M_c -Werte geben Einblick in die Struktur des Netzwerkes: Da das mittlere Molekulargewicht eines Aminosäurerestes in Collagen etwa 93 Da beträgt^[57], entspricht ein M_c -Wert von 14 kDa einem nicht stark vernetzten Polymer mit einer durchschnittlichen Netzwerk-Kettenlänge von ca. 151 Aminosäuren. Eine Aminosäureanalyse von Collagen aus Sehnen ergibt etwa 2.7 Mol-% Lysylreste^[57]; d. h. ein Lysylrest kommt auf 37 Reste. Wenn wir die oben gerechtfertigte Annahme machen, daß Glutaraldehyd nur Lysylreste angreift, dann bedeutet ein M_c -Wert von 14 kDa, daß nur grob 25% der verfügbaren ϵ -Aminogruppen reagiert haben.

Collagen verfügt wie andere Proteine auch über mehrere strukturelle Ebenen. Wir folgen der von *Linderström-Lang*^[58] und *Kauzmann*^[59] vorgeschlagenen Nomenklatur zur Beschreibung der strukturellen Organisation von Proteinen und spezifizieren sie für die Collagenstruktur^[32] (vgl. Abb. 2). Die *Primärstruktur* von Collagen gibt die vollständige Aminosäuresequenz aller drei Polypeptidketten an sowie die Vernetzungsstellen zwischen den Ketten. Die *Sekundärstruktur* ist die lokale Konformation einer Polypeptidkette, die von den stereochemischen Winkeln und Wasserstoffbrückenbindungen bestimmt wird. Die *Tertiärstruktur* beschreibt die globale Konformation der Polypeptidketten, d. h. das Muster, nach dem die Sekundärstrukturen inner-

halb eines Collagenmoleküls zusammengesetzt sind. Sie ist die Substruktur, die als stabile Einheit in Lösung (als Tripelhelix-Molekül) existieren kann. Die vierte Ordnung oder *Quartärstruktur* bezeichnet die supermolekulare Struktur der Einheiten, umfaßt mehrere Moleküle in einem spezifischen Gitter, einem Basiselement des festen Zustands. Höhere Ordnungsebenen, die zu großen, mit bloßem Auge sichtbaren anatomischen Einheiten führen, wurden vorgeschlagen^[60, 61].

Collagen kann auf zwei diskreten Ebenen struktureller Ordnung kristallisieren: Die Tertiärstruktur (Tripelhelix) (vgl. Abb. 2C) kann kristallin sein und die Quartärstruktur (Gitter aus Tripelhelices) (vgl. Abb. 2D). Optische Rotation, Circular dichroismus und Viskosimetrie sind geeignete Methoden, um in Lösung den Übergang des tripelhelicalen Collagens in statistisch geknäuelte Gelatine zu untersuchen^[54]. Der Einsatz optischer Methoden zur Analyse des Gelatinegehaltes von festen Proben, z. B. von aus der Lösung gegossenen Filmen, ist jedoch wegen der optischen Anisotropie des festen Proteins kompliziert.

Es wurden Verfahren zur quantitativen Analyse von Collagen und Gelatine in festen, nicht ganz kristallinen Proben entwickelt, um die starke Beschleunigung des enzymatischen Abbaus zu untersuchen, die beobachtet wird, wenn Collagen zu Gelatine umgewandelt wird^[62, 63]. Eine intakte Tertiärstruktur (Tripelhelix) in festem Zustand kann durch mittel-

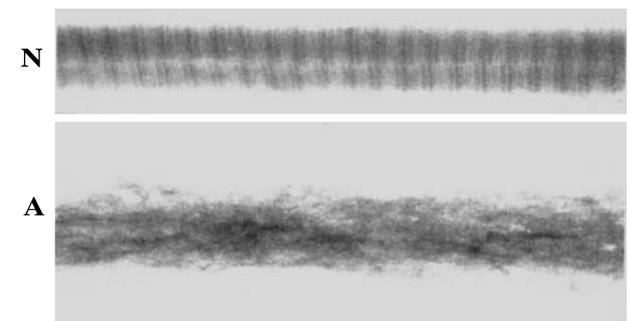
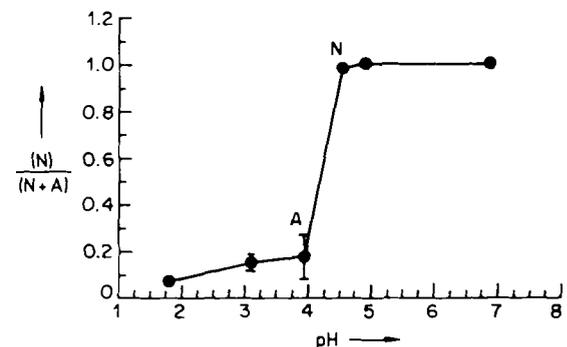


Abb. 5. Das Bändermuster der Collagenfasern besteht bis zu einem pH-Wert von 4.25 ± 0.30 in 0.05 M Essigsäure (N). Eine Periodenlänge beträgt 65 nm. Der Anteil der gebänderten Fibrillen $\frac{N}{N+A}$ wurde transmissionselektronenmikroskopisch bestimmt. Unterhalb von $pH 4.25 \pm 0.30$ verschwindet die Bänderung fast aller Fasern, und der Faserdurchmesser wird größer (A) (Quellung in der wäßrigen Essigsäurelösung). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, daß ein kleiner Teil der gebänderten Fibrillen, etwa 10% oder weniger, jenseits des Schwellen-pH-Werts auch nach langer Zeit im Quellmittel überdauert. Bei der Umwandlung geht die Quartärstruktur verloren (die Packordnung der Helices, Abb. 2D), die Tertiärstruktur (Tripelhelix, Abb. 2C) bleibt erhalten. Anders als ungebändertes Collagen löst gebändertes eine Blutplättchenaggregation aus. Periodenlänge des gebänderten Collagens etwa 65 nm (nach [70, 71]).

und niederfrequente IR-Spektroskopie nachgewiesen werden: Mit „helical marker“-Banden kann quantitativ gemessen werden, in welchem Ausmaß eine Collagenpräparation in Gelatine umgewandelt worden ist^[32, 64]. Auch durch Messung der optischen Rotation läßt sich der Gelatineanteil in festen Proben ermitteln, wenn der tensorische Charakter der optischen Aktivität und die in Collagenproben häufig vorkommende Doppelbrechung berücksichtigt werden^[65].

Elektronenmikroskopisch können die periodische Bänderung von Collagenfibrillen gezeigt^[66–69] und die durchschnittliche Länge von Collagenfibrillen mit deutlicher Bänderung abgeschätzt werden^[70, 71]. Dieser morphologische Zugang wird durch Messung der Röntgenkleinwinkelstreuung ergänzt^[72]. Mit diesen Methoden wurde gezeigt, daß die Collagenfibrillen in verdünnter Essigsäure ihre Bänderung bei einem pH-Wert von 4.25 ± 0.30 einbüßen (Abb. 5)^[71]. Durch den kombinierten Einsatz von Elektronenmikroskopie und IR-Spektroskopie wurde klar, daß bei der Umwandlung zwar die Gitterstruktur zerstört wird, nicht aber die Tripelhelixstruktur^[71]. Durch Veränderungen des pH-Wertes kann also die Quartärstruktur selektiv zerstört werden, während die Tertiärstruktur intakt bleibt. Mit dieser experi-

mentellen Strategie wurde es möglich zu zeigen, daß das Phänomen der Aggregation von Blutplättchen durch Collagenfibrillen eine spezifische Eigenschaft der Quartärstruktur und nicht der Tertiärstruktur ist^[71]. Dazu wurde Collagen in einer thromboresistenten Form hergestellt, indem die Packordnung der Helices selektiv „ausgeschmolzen“ wurde, während die Helices selbst intakt blieben^[71]. Abbildung 6 zeigt das Muster der Bänderung von Collagen-GAG-Copolymer-Matrices. Man beachte, daß lange Segmente nichtgebänderter Collagenfibrillen gelegentlich von kurzen Segmenten gebänderter Collagenfibrillen unterbrochen werden (Abb. 6, Kästchen).

Die Porosität eines Collagen-GAG-Copolymers ist unabhängig für die biologische Aktivität^[73]. Poren werden erzeugt, indem eine sehr verdünnte Lösung des Collagen-GAG-Copräzipitats zuerst eingefroren wird und dann die Eiskristalle im Vakuum bei niedrigen Temperaturen sublimiert werden^[74]. Die resultierende Porenstruktur ist daher eine Negativkopie des Eiskristallnetzes (Dendriten). Folglich kann durch Variation der Bedingungen, unter denen sich die Eiskristalle bilden und wachsen, eine Vielzahl von Porenstrukturen hergestellt werden. In der Praxis nimmt der durchschnittliche Porendurchmesser mit sinkender Temperatur ab, während die Orientierung der Porenkanalachsen zusätzlich von der Größe des Hitzeflußvektors beim Einfrieren abhängt. Es lassen sich Implantate mit einem mittleren Porendurchmesser zwischen 1 und 800 μm herstellen, die Volumenanteile der Poren erreichen bis zu 0.995, die spezifische Oberfläche läßt sich zwischen 10^4 und 10^8 mm^2/g Matrix variieren, und die Orientierung der Porenkanalachsen in zylindrischen Implantaten reicht von strikt uniaxial über statisch bis hin zu streng radial. Abbildung 7 zeigt, welche unterschiedliche Porenstrukturen durch Steuerung von Kristallkeimbildung und -wachstum sowie durch Steuerung des Hitzeflußvektors erreicht werden können.

Die biologische Aktivität der Collagen-GAG-Copolymere hängt im allgemeinen von der Struktur der porösen Matrix ab, d. h. vom Volumenanteil der Poren, von der spezifischen Oberfläche, der mittleren Porengröße und der Orientierung der Poren in der Matrix. Diese Eigenschaften können stereologisch^[75, 76] bestimmt werden, indem die quantitativen statistischen Eigenschaften der dreidimensionalen Strukturen zu denen ihrer zweidimensionalen Schnitte oder Projektionen in Beziehung gesetzt werden. Umgekehrt ermöglichen stereologische Verfahren auch die Rekonstruktion bestimmter Eigenschaften dreidimensionaler Objekte aus einer quantitativen Analyse zweidimensionaler Abbildungen^[76]. Durch die Entwicklung halb- oder vollautomatischer Apparate zur quantitativen Bildanalyse wurden die stereologischen Untersuchungen sehr erleichtert. Eine Ebene durch eine zweiphasige Struktur kann durch Zufallsproben (Abb. 8 A), regelmäßige Proben (Abb. 8 B), sehr dichte, fast flächendeckende kleine Proben (Abb. 8 C) oder durch Proben entlang einer Geraden (Abb. 8 D) charakterisiert werden. Man kann zeigen^[75, 76], daß der Volumenanteil der Poren V_V gleich dem Anteil der gesamten Testpunkte P_p ist, die in die Porenregion fallen, gleich dem Anteil der Poren A_A an der Gesamtfläche und ebenso gleich dem Porenanteil L_L an einer linearen, unendlich dichten Punktereihe [Abb. 8 D, Gl. (3)].

$$V_V = P_p = A_A = L_L \quad (3)$$

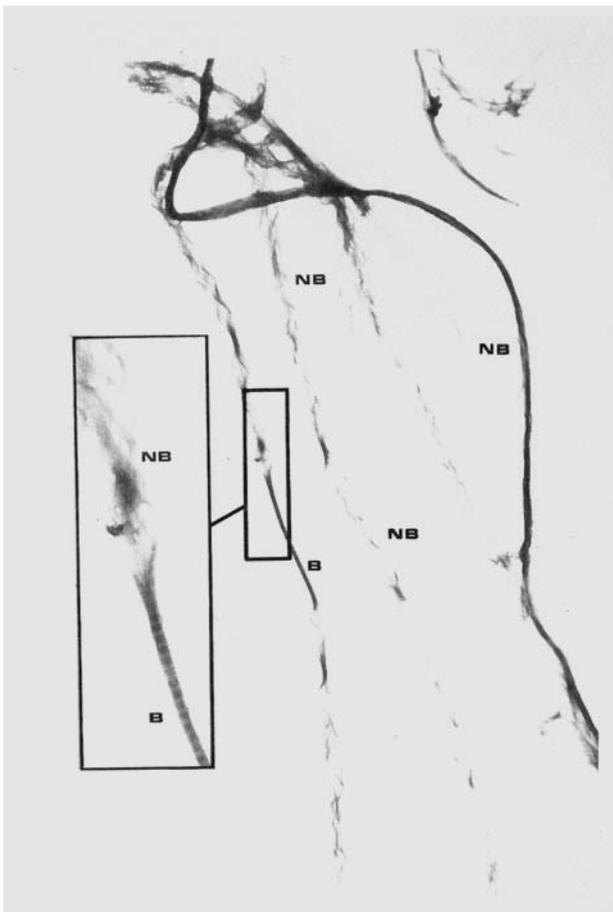


Abb. 6. Wird der pH-Wert unter 4.25 ± 0.30 gesenkt, so verschwindet die Bänderung von Typ-1-Collagen aus Rinderhaut praktisch ganz. Kurze Abschnitte gebänderten Collagens (B) existieren neben sehr langen Abschnitten nicht gebänderten Collagens (NB), das eine Tertiär-, aber keine Quartärstruktur aufweist. Diese Präparation induziert keine Blutplättchenaggregation, vorausgesetzt, die Fasern werden an der Rekristallisation und Bildung von Bänderstrukturen gehindert, wenn bei neutralem pH-Wert der Blutplättchenversuch durchgeführt wird. Gefärbt mit 0.5 Gew.-% Phosphowolframsäure; Periodenlänge des gebänderten Collagens etwa 65 nm (nach [70]).

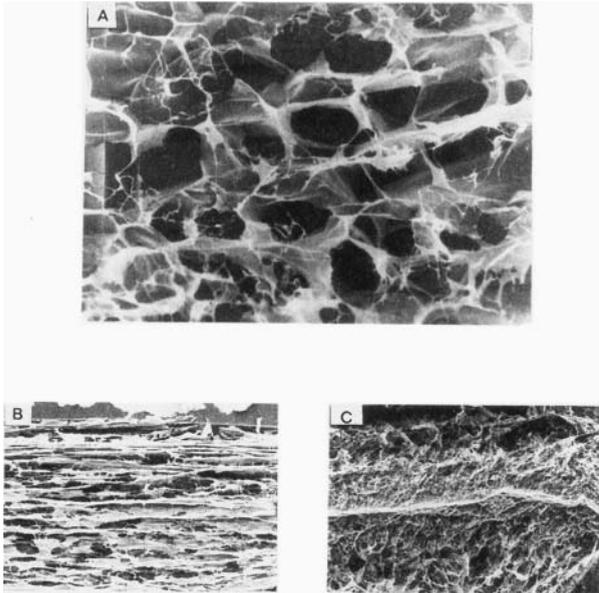


Abb. 7. Porenstrukturen, die mit Collagen-GAG-Copolymeren erhalten werden können, wenn die Eiskristallisation entsprechend gesteuert wird (Rasterelektronenmikroskopie). Poren bilden sich, wenn Eisdendriten sublimiert werden. Die Porenstruktur der Collagen-GAG-Matrices ist die Negativreplik der Eiskristallstruktur, die sich bildet, wenn die verdünnte feine Suspension des Collagen-GAG-Coprazipitats unter 0 °C abgekühlt wird. A: Die Orientierung der Porenkanalachsen ist zufällig und charakterisiert Matrices, die eine Hautregeneration induzieren. Mittlerer Porendurchmesser etwa 100 µm, Volumenanteil der Poren etwa 0.99. B: In dieser Matrix sind die Porenkanäle streng uniaxial orientiert (Querschnitt einer zylindrischen Matrix mit einem Durchmesser von 1.5 mm). Sie wurde verwendet, um die Regeneration des Ischiasnervs der Ratte über eine Lücke zu induzieren. Mittlerer Porendurchmesser etwa 100 µm. C: Durch radiale Orientierung der Porenkanalachsen entsteht ein Implantat, das – im Vergleich zum Implantat mit uniaxialer Orientierung – die Synthese eines weniger funktionalen Ischiasnervregenerats induziert. Zylinderdurchmesser 1.5 mm. Mittlerer Porendurchmesser etwa 50 µm.

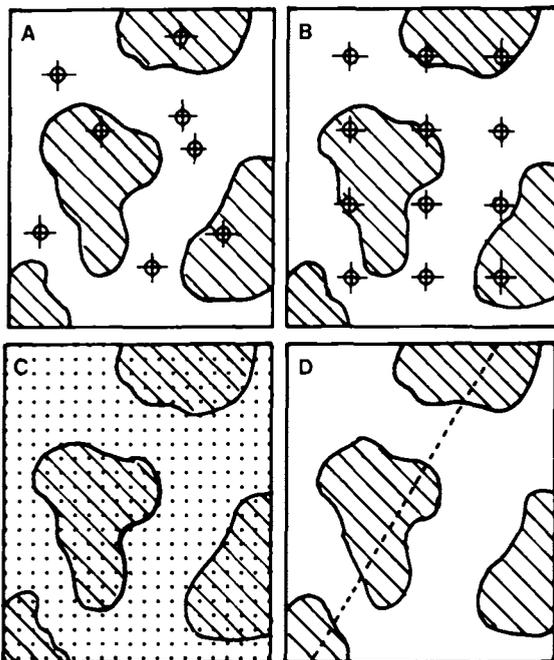


Abb. 8. Schematische Darstellung der vier wichtigsten Verfahren zur Bestimmung eines Feldes durch stereologische Analyse. Mit diesen Verfahren wurden die Porenstruktur von Collagen-GAG-Matrices [74] untersucht und die Werte für mittlere Porendurchmesser, Porenvolumenanteil und andere Eigenschaften bestimmt. In dieser Zeichnung ist ein Phase (schraffiert) in einer kontinuierlichen anderen Phase (weißer Hintergrund) eingebettet. A: Zufällige Punkte-zählung. B: Systematische Punkte-zählung. C: Flächenanalyse. D: Lineare Analyse (nach [76]).

Diese Verfahren zur Charakterisierung bilden die Grundlage aller stereologischen Methoden und werden Punkte-zählung (Abb. 8 A, B), Flächenanalyse (Abb. 8 C) und Linearanalyse (Abb. 8 D) genannt. Es ist klar, daß die zufällige Auswahl der Stichproben und Testmethoden von größter Bedeutung ist. Durch systematischen Einsatz dieser Methoden konnten die Porenstrukturen von Collagen-GAG-Matrices fast vollständig charakterisiert werden [74].

4. Biologische Aktivität und Matrixstruktur

Die Definition der „biologischen Aktivität“ bezieht sich notwendigerweise auf hochspezifische Assays, die selbst streng operational definiert werden. Untersuchungen mit Collagen-GAG-Matrices haben sich auf die Regeneration spezifischer Gewebe, die sich nicht spontan regenerieren, konzentriert. Man muß daher Assays finden, mit denen die Wirkung bestimmter struktureller Eigenschaften der Collagen-GAG-Matrices auf die de-novo-Synthese eines Gewebes untersucht werden kann. Dieses Problem ähnelt auf den ersten Blick der Suche nach Versuchsanordnungen, mit denen die Wirkung mehrerer heterogener Katalysatoren auf die Ausbeute an makromolekularen Produkten in einem bestimmten Reaktor untersucht werden soll.

Die Aktivität von Regenerationsmatrices ist in zwei relativ gut definierten Umgebungen untersucht worden: in der

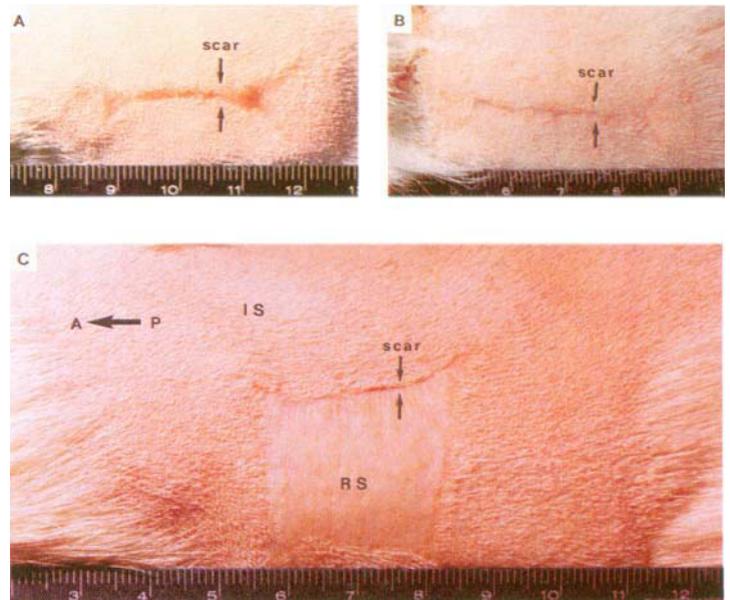


Abb. 9. Das Endergebnis der Heilung tiefer Hautwunden beim Meerschweinchen, die auf verschiedene Weise behandelt wurden. A: Eine unbehandelte Hautwunde schließt sich etwa nach 20 Tagen und bildet eine linienförmige Narbe (Pfeile). Die Wundfläche verkleinert sich durch Kontraktion bis zum Tag 8 ± 1 um 50%. B: Eine Hautwunde, die mit einer aktiven, aber nicht mit Zellen besäten Collagen-GAG-Matrix behandelt wurde, schließt sich durch stark verzögerte Kontraktion nach etwa 40 Tagen (Pfeile). Die Wundfläche verkleinert sich durch Kontraktion bis zum Tag 27 ± 2 um 50%. C: Eine Hautwunde, die mit einer aktiven, mit Hautzellen besäten Collagen-GAG-Matrix behandelt wurde, schließt sich nicht durch Kontraktion. Der Wundrand kontrahiert leicht, aber die Wunde schließt sich hauptsächlich durch Synthese neuer Haut, die sich komplett mit Dermis und Epidermis bildet, aber haarlos ist. RS: regenerierte Haut, IS: intakte Meerschweinchenhaut, AP: Längsachse des Tieres (A: vorn, P: hinten). Der ursprüngliche Wundrand bildet sich zu einer Narbenlinie (Pfeile) um, die regenerierte Haut von intakter Haut trennt. Die Skalen zeigen cm. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Massachusetts Institute of Technology.

Wunde, die entsteht, wenn Haut vom Meerschweinchen und vom Mensch in voller Dicke herausgeschnitten wird^[17,18], und in den 10–15 mm langen Lücken nach Durchtrennung des Ischiasnervs der Ratte^[19,20]. Beides sind Wunden, die routinemäßig chirurgisch hergestellt werden, und in beiden Fällen sind die „Kinetik“ und der „Mechanismus“ der normalen Wundheilung genau untersucht worden. Die normale Heilung einer tiefen Hautwunde beginnt einige Stunden nach dem Herausschneiden der Haut mit einer Kontraktion des Wundrandes. Nach etwa zwei Wochen hat sich Narbengewebe gebildet (Abb. 9)^[17,18]. Narbengewebe unterscheidet sich von normaler Haut in mehrerlei Hinsicht in der Ultrastruktur sowie in den optischen und mechanischen Eigenschaften. Eine Heilung des durchtrennten Ischiasnervs beginnt mit der Bildung von Neuomen an beiden Schnittenden (Abb. 10)^[19,20]. Dieses ungerichtet wachsende Nervengewebe verbrückt jedoch nicht die Lücke zwischen den Schnittstellen, so daß eine Lähmung zurückbleibt.

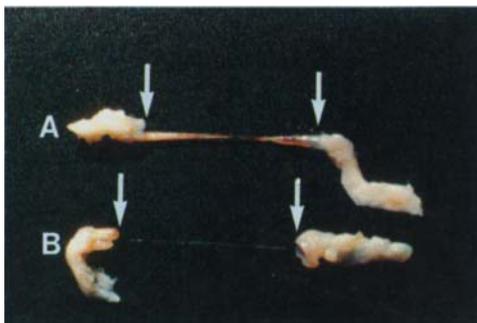


Abb. 10. Explantate vom Ischiasnerv der Ratte sechs Wochen nach zweimaliger Behandlung der 15 mm großen Lücke. Die Siliconschläuche wurden vor dem Photographieren entfernt. A: Der regenerierte Ischiasnerv überspannt die gesamte 15 mm lange Lücke (Pfeile), die mit einem zylindrischen Collagen-GAG-Implantat überbrückt wurde, dessen Porenstruktur der in Abbildung 7 B gezeigten ähnelt. Die Matrix wurde in einem Silicongummischlauch gebildet, und die Schnittenden des Nerven wurden in die Schlauchenden gebracht. Der neue Nerv ersetzt vollständig die enzymatisch abgebaute Collagen-GAG-Matrix, die über 15 mm innerhalb des Siliconschlauchs reichte. B: Ein dünner Bindegewebsfaden, aber kein Nerv, wächst über die 15 mm-Lücke, wenn diese mit einem leeren Siliconschlauch überbrückt wird (nach [88]).

Der gravierendste Unterschied zwischen einer Regenerationsmatrix und einem Katalysator besteht darin, daß die Matrix während des Reaktionsverlaufes verbraucht wird. Implantierte Collagen-GAG-Matrices werden durch Collagenasen^[77,78], also spezifische Enzyme, die die Tripelhelices an einer bestimmten Stelle angreifen, abgebaut. Es entstehen zwei charakteristische Produkte; das N-terminale Dreiviertelfragment und das C-terminale Einviertelfragment, die beide bei physiologischen Temperaturen spontan zu Gelatine denaturiert werden^[77]. Die gelatinisierten Fragmente werden dann durch unspezifische Proteasen abgebaut. Collagenasen kommen natürlich in heilenden Wunden vor und bauen dort Collagenfasern ab. Ungefähr zur gleichen Zeit, wenn Collagen und andere ECM-Komponenten im Wundbett abgebaut werden, werden diese Komponenten von Zellen im Wundbett auch synthetisiert. Der gesamte Vorgang wird Umgestaltung genannt^[2-4]. Das Gleichgewicht zwischen beiden Einzelvorgängen wird als wichtiges Charakteristikum der Wundheilung gewertet^[79-81].

Durch chemische Analoga der ECM, die von Collagenasen über eine variable Zeitspanne abgebaut werden, wurde es möglich, die Auswirkungen von abbaubaren ECMs auf ein Wundheilungsmodell quantitativ zu untersuchen. Nachdem das ECM-Analogon in engen physikalisch-chemischen Kontakt mit dem Wundbett gebracht worden ist und sichergestellt wurde, daß Zellen aus dem Wundbett ungehindert in die Poren des Analogons einwandern können, kann man fragen: Wie beeinflusst eine gezielte Variation der Abbaugeschwindigkeit der ECM den Wundheilungsmechanismus? Obwohl es sich nur um ein Wundmodell handelt, ist es äußerst wichtig, ein sorgfältig geplantes in-vitro-Experiment zu entwerfen, mit dem Hypothesen über Wechselwirkungen zwischen Matrix und spezifischen Komponenten des Wundbettes geprüft werden können. Schlüssige Ergebnisse über isolierte mechanistische Schritte können gewöhnlich nicht durch ein komplexes in-vivo-Modell gewonnen werden.

Die Abbaugeschwindigkeit von Collagen-GAG-Matrices durch Collagenasen kann in vitro durch mindestens zwei Methoden gemessen werden, die sich ergänzende Ergebnisse liefern. Bei der ersten Methode wird eine feine Suspension des Implantates in einem gerührten, standardisierten Collagenasebad inkubiert. Beim Abbau entstehen Oligopeptide, die photometrisch analysiert werden^[82,83]. Die zweite Methode ist ein mechanochemisches Verfahren, bei dem schmale Matrixstreifen in einem standardisierten Collagenasebad gedehnt werden und die Abbaukinetik durch Messung der Kraft bestimmt wird, die notwendig ist, um die Probe in einem bestimmten Dehnungszustand zu halten^[22,49,62]. Die erste Methode mißt den Anteil des abgebauten Proteins, während mit der zweiten Methode der Anteil des unverdauten Proteins, das in Form eines unter Belastung stehenden Netzwerkes weiterbesteht, bestimmt wird. Zusätzliche Untersuchungen sind nötig, um die Informationen aus beiden komplementären Messungen zu korrelieren. Einige interessante Strategien zur Kontrolle der Resistenz des Implantats gegen Collagenasen konnten aus in-vitro-Assays abgeleitet werden. Eine systematische Untersuchung der Abbaugeschwindigkeiten von Collagenproben, die mit Formaldehyd, Glyoxal und Glutaraldehyd quervernetzt worden waren (M_c -Bereich zwischen ca. 5 und 25 kDa), ergab, daß die Abbaugeschwindigkeit mit steigendem Molekulargewicht zwischen den Quervernetzungen linear bis auf das 15fache wächst^[49,62]. Auch wurde ein etwa zehnfacher Anstieg der Abbaugeschwindigkeit bei der Umwandlung in Gelatine registriert^[62]. Neu war der Befund, daß die Resistenz gegen Collagenolyse bis auf das Fünffache ansteigt, wenn bis zu 8 Gew.-% Chondroitin-6-sulfat auf Collagen aufgepfropft werden; ein größerer Chondroitin-6-sulfat-Anteil bewirkt keine weitere Zunahme der Resistenz^[49,81].

In-vivo-Untersuchungen während der ersten sieben bis zehn Tage nach der Implantation haben die Gültigkeit dieser in-vitro-Effekte bestätigt; während der zweiten Woche traten jedoch wichtige und aufschlußreiche Abweichungen von den in-vitro-Ergebnissen auf. So führte z. B. eine höhere M_c während der ersten zehn Tage nach der Implantation zum beschleunigten Abbau der subcutan implantierten Matrices, während mit Chondroitin-6-sulfat aufgepfropftes Collagen in dieser Zeitspanne verzögert abgebaut wurde^[22,81]. Dies war aufgrund der in-vitro-Befunde auch zu erwarten. Während der zweiten Woche wurde jedoch beobachtet, daß Implantate mit mehr als 2 Gew.-% aufgepfropftem GAG ein

erhöhtes Gesamtrockengewicht sowie einen erhöhten Collagengehalt aufwiesen. Im Gegensatz dazu verloren Implantate, bei denen der GAG-Anteil niedriger oder gleich null waren, während dieser Zeit kontinuierlich an Gewicht bei konstantem relativem Collagengehalt^[22, 73, 81]. Histologische Untersuchungen zeigten, daß der Nettoanstieg des totalen Trockengewichts und folglich der Anstieg des relativen Collagengehalts mit der Synthese von neuem Bindegewebe nahe der abgebauten Matrix einhergeht^[73, 81]. Die einfachen in-vitro-Assays zur Messung der Abbaugeschwindigkeit von Matrices können demnach nur auf die frühen Phasen der Wundheilung übertragen werden.

Physikalisch-chemische Manipulationen der Matrix haben einen bemerkenswerten Einfluß auf die Kinetik und den Mechanismus der Wundheilung. Einer der auffälligsten Vorgänge nach der chirurgischen Hautentfernung bei Nagetieren und Menschen ist die Kontraktion des Wundperimeters. Im Nagetiermodell, wo die Kontraktion besonders ausgeprägt ist, endet dieser Vorgang, wenn die beiden gegenüberliegenden Wundränder sich einander eng genähert haben und Narbengewebe im Zwischenraum synthetisiert worden ist (vgl. Abb. 9A). Beim Menschen hört die Kontraktion eher auf, und die Wundränder sind durch mehr Narbengewebe getrennt. Man weiß jetzt, daß die Hautwundkontraktion so weit hinausgezögert werden kann, daß sie erst etwa zehn Tage nach Erhalt der Wunde beginnt und nicht schon nach ein bis zwei Tagen. Hierzu müssen die Collagen-GAG-Matrices eine Reihe klar definierter Eigenschaften haben: Der Widerstand gegen Abbau muß über einem kritischen Wert liegen (Abb. 11), d. h. es dürfen nicht mehr als

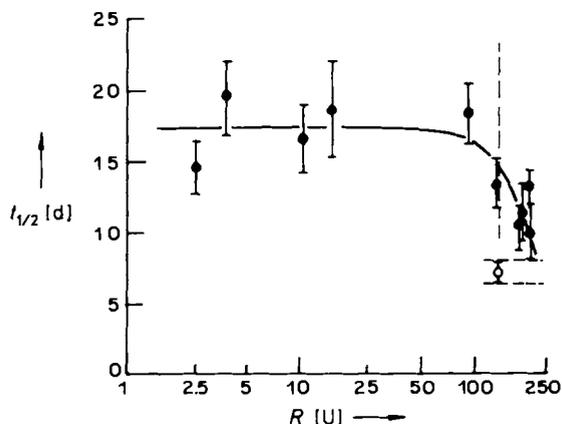


Abb. 11. Abhängigkeit der Halbwertszeiten $t_{1/2}$ der Hautwunden von der Abbaugeschwindigkeit R (in Collagenase) der Collagen-GAG-Matrix. Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ ist die Zeit, die eine Wunde benötigt, um auf 50% der ursprünglichen Fläche zu schrumpfen. Der Abbau ist in willkürlichen Einheiten angegeben, die aus in einem in-vitro-Assay abgeleitet wurden. Eine etwas willkürliche gestrichelte Linie bei $R = 140$ Enzymeinheiten zeigt die Abbaugeschwindigkeit, jenseits derer die Halbwertszeit der Wunde schnell auf die Werte für unbehandelte Wunden (\circ) fällt. Die horizontale Skala ist logarithmisch (nach [84]).

etwa 50% des Trockengewichts des Implantats in zehn Tagen verloren gehen. Ferner muß der mittlere Porendurchmesser zwischen 20 und 120 μm liegen (Abb. 12); das entspricht einer spezifischen Oberfläche von 10^6 – 10^7 mm^2/g trockener Matrix^[84]. Vorläufige Untersuchungen haben auch gezeigt, daß die Collagenbänderung in Implantaten fast ganz unterdrückt werden muß (vgl. Abb. 6), während die

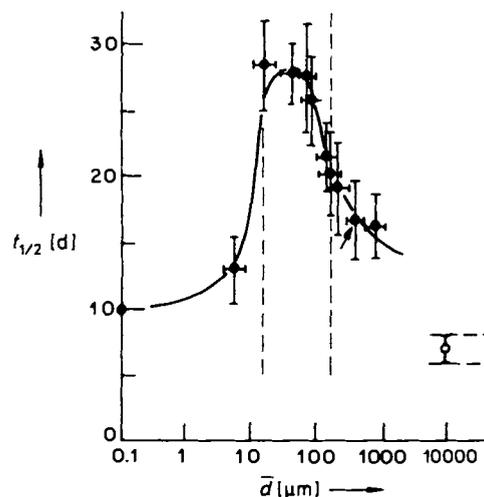


Abb. 12. Abhängigkeit der Halbwertszeiten $t_{1/2}$ der Hautwunden vom mittleren Porendurchmesser \bar{d} der Collagen-GAG-Matrices, die als Transplantate für tiefe Hautwunden beim Meerschweinchen benutzt werden. Die gestrichelten vertikalen Linien bei etwa 20 und 120 μm markieren die Grenzen der Matrixaktivität. Jenseits dieser Grenzen sinkt die Wundhalbwertszeit rasch auf Werte für unbehandelte Wunden (\circ). Die horizontale Skala ist logarithmisch (nach [84]).

Tripelhelixstruktur intakt bleibt^[71, 84]; schließlich muß der Volumenanteil der Poren größer als 0.95 sein^[84].

Werden Collagen-GAG-Matrices, die den Beginn der Wundkontraktion signifikant hinauszögern, mit wenigen, leicht trennbaren Hautzellen (Basalzellen) desselben Tieres besät und diese Matrices dann verpflanzt, so wird die Wundheilung noch tiefgreifender beeinflußt: In diesem Fall ist nicht nur der Beginn der Wundkontraktion um zehn Tage hinausgezögert, sondern die Kontraktion bricht ein paar Tage nach Beginn auf halbem Wege ab; anschließend dehnt sich die Wunde einige Tage lang aus, bis der Prozeß langsamer wird und schließlich ganz aufhört (Abb. 13). Nach einigen Wochen umschließt der Wundperimeter etwa 65% der ursprünglichen Wundfläche, und neue Haut – vollständig mit Dermis und Epidermis – füllt dieses Gebiet aus (vgl.

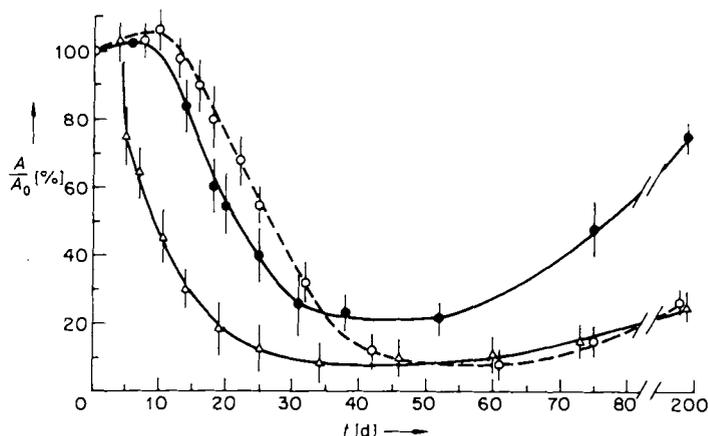


Abb. 13. Zeitliche Veränderungen der ursprünglichen Wundfläche A_0 , wenn tiefe Hautwunden des Meerschweinchens mit inaktiven Collagen-GAG-Matrices (Δ), aktiven zellfreien Collagen-GAG-Matrices (\circ) und aktiven, mit Zellen besäten Collagen-GAG-Matrices behandelt wurden (\bullet). Aktive zellfreie Matrices verzögern den Beginn der Kontraktion signifikant, aber führen nicht zu Kontraktionsabbruch und Hautregeneration. Aktive, mit Zellen besäte Matrices verzögern zunächst den Kontraktionsbeginn, unterbrechen später die Kontraktion und induzieren die Hautregeneration in einem Wundbett, das wieder größer wird (nach [84]).

Abb. 9 C)^[85]. Wurde die Matrix vorher nicht mit Hautzellen besät, so verzögert sich die Kontraktion signifikant, aber die Wunde wird mit Narbengewebe geschlossen (vgl. Abb. 9 B). Die mit zellbesäten Matrices synthetisierte neue Haut ist haarlos. Aus Lichtstreuungsuntersuchungen^[86] und histologischen Studien^[84, 85, 87] folgt, daß sie sich vom Narbengewebe unterscheidet und normaler Haut ähnelt, aber nicht mit ihr gleichzusetzen ist. Die morphologischen und physikalischen Unterschiede zwischen neuer Haut und Narbengewebe sind in den Abbildungen 14 und 15 dargestellt. Die Kinetik der Hautwundenkontraktion ist in Abbildung 16 zusammengefaßt. Anhand ihrer kinetischen Daten werden die Collagen-GAG-Matrices in drei Klassen unterteilt: inak-

tive Matrices, aktive Matrices, die nicht mit Zellen besät wurden, und aktive Matrices, die mit wenigen Zellen besät wurden. Andere Collagen-GAG-Matrices induzieren die Regeneration eines fast intakten Ischiasnerves der Ratte über eine Lücke von 15 mm, ohne daß eine Besaat mit Zellen notwendig ist (vgl. Abb. 10)^[88].

Über einem teilweise oder ganz intakten Dermisbett kann sich eine Epidermis schnell regenerieren, eine de-novo-Synthese von Dermis kommt jedoch nicht spontan vor^[17, 18]. Ähnlich regeneriert sich der Ischiasnerv der Ratte spontan über eine Lücke von 5 mm oder manchmal auch 10 mm (wenn die Schnittflächen des Nervis in ein Gummiröhrchen mit Salzlösung eingetaucht werden), aber nicht über eine

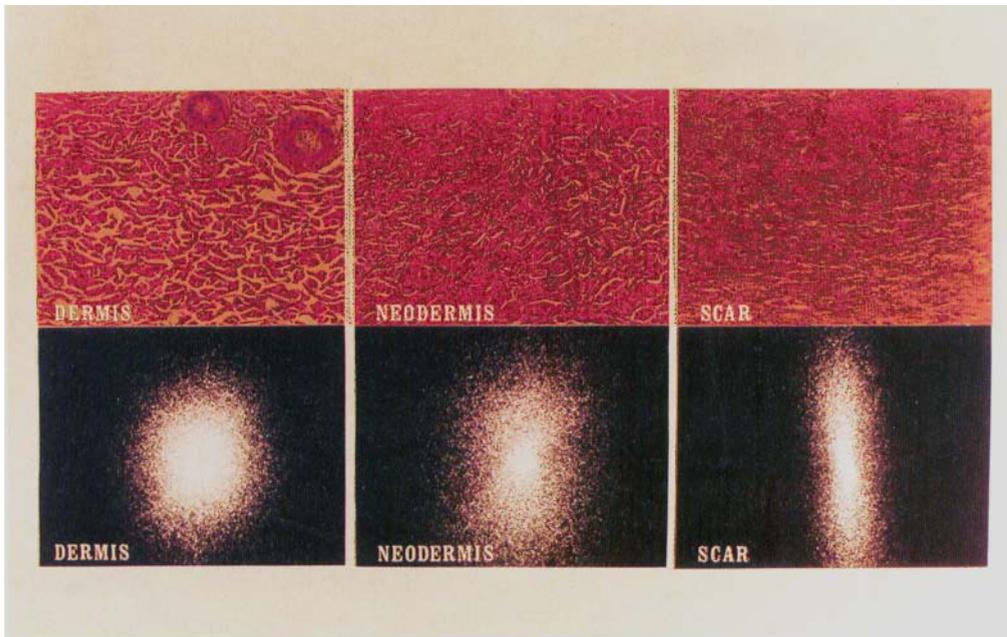


Abb. 14. Vergleich der durch Lichtmikroskopie von Gewebeschnitten gewonnenen histologischen Daten (obere Reihe) mit Mustern, die durch Kleinwinkelstreuung von sichtbarem Laserlicht an denselben Gewebeschnitten erhalten wurden (untere Reihe). Die Gewebeschnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt; die Art der histologischen Färbung scheint das Lichtstreuungsmuster jedoch nicht zu beeinflussen. Links: In der normalen Dermis des Meerschweinchens sind die Collagenfasern statistisch angeordnet; es ergibt sich ein elliptisches Streuungsmuster. Mitte: In der regenerierten Dermis sind die Collagenfasern weniger zufällig angeordnet; daraus resultiert ein Streuungsmuster, das deutlich anisometrischer als das der intakten Dermis ist. Rechts: In dermalen Narben (scar = Narbe) sind die Collagenfasern stark ausgerichtet, wie auch am Streuungsmuster deutlich wird (nach [13]).

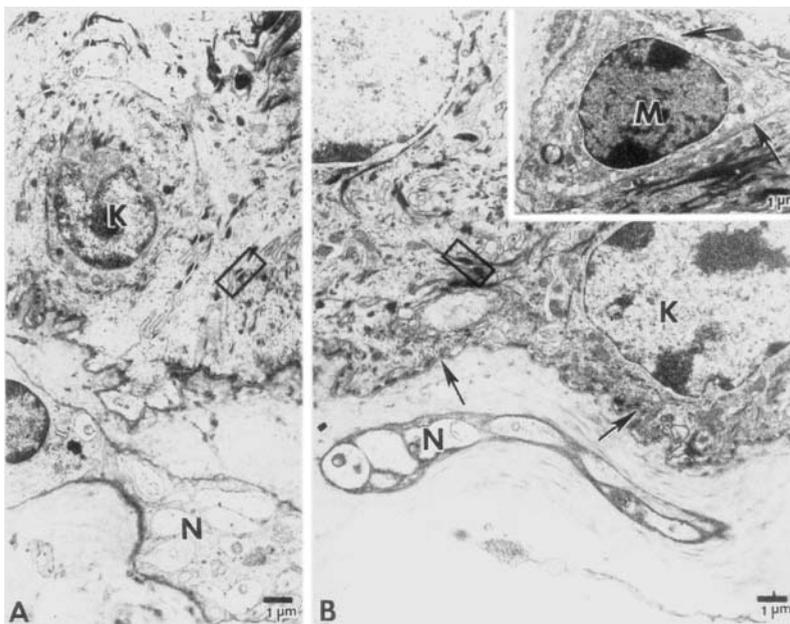


Abb. 15. A: Normale Meerschweinchenhaut (Elektronenmikroskop). Die Epidermis wird von Keratinozyten (K) gebildet, die durch Knotenpunkte (Desmosomen, im Kästchen) verbunden sind. Man beachte die charakteristischen nicht myelinisierten Nervenfasern (N) in der Dermis. B: Regenerierte Haut - 14 Monate, nachdem die Wunde mit einer aktiven, mit Hautzellen besäten Collagen-GAG-Matrix behandelt wurde. Die Neoepidermis wird von Keratinozyten (K) gebildet, die mit denen der intakten Haut identisch sind. Desmosomen (im Kästchen) und Basallamina (Pfeile) sind gut ausgeprägt und erscheinen normal. Auch Melanosomen (M) mit ihren charakteristischen Melanosomen (Pfeile) wandern wieder in die Neoepidermis ein, wo sie ganz normal Pigmente produzieren und abgeben. Dermale Nervenfasern (N), die denen in normaler Haut ähneln, sind auch vorhanden (nach [81]).

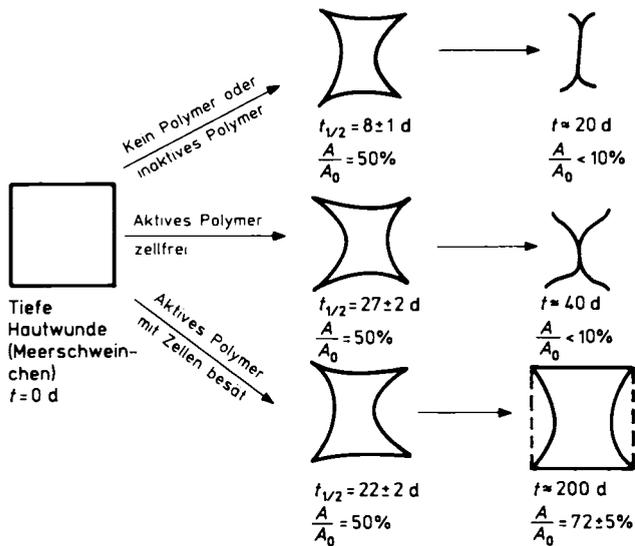


Abb. 16. Nach ihrer Wirkung auf tiefe Hautwunden von Meerschweinchen werden die Collagen-GAG-Matrices in drei Klassen eingeteilt: Eine inaktive Matrix verzögert die Wundkontraktion nicht signifikant und führt zur Bildung einer linienförmigen Narbe. Eine aktive, zellfreie Matrix verzögert die Wundkontraktion um etwa 20 Tage, danach findet jedoch eine volle Kontraktion statt. Eine aktive Matrix, die mit wenigen Zellen besät wurde, verzögert die Kontraktion signifikant, unterbricht sie später und induziert die Synthese einer neuen Dermis und Epidermis innerhalb eines expandierenden Wundperimeters (vgl. Abb. 9) (nach [90]).

Lücke von 15 mm Länge^[19, 20]. Der richtige Einsatz von Collagen-GAG-Matrices führt zur Synthese von Haut mit Dermis und Epidermis (vgl. Abb. 15) sowie zur Synthese neuer Ischiasnerven (vgl. Abb. 10A). Diese Fähigkeit, die de-novo-Synthese von fast physiologischem Gewebe unter Bedingungen zu induzieren, unter denen sich das Gewebe nicht spontan regeneriert, unterscheidet Regenerationsmatrices von den vielen Collagenen und Collagen-GAG-Matrices, die in dieser Hinsicht biologisch inaktiv sind.

Die klinischen Anwendungen von ECM-Analoga sind konkurrenzlos. Patienten, die massive Verbrennungen erlitten und viel Haut verloren haben, brauchen sofortigen Ersatz der verlorenen Hautbereiche, um ihre Flüssigkeitsverluste zu regulieren und großflächige Infektionen zu vermeiden. Die gegenwärtig beste Methode ist eine Eigenverpflanzung der Haut, d. h. die eigene Haut des Patienten muß durch eine schwere Operation gewonnen werden. Ein ECM-Analoga, das fast identisch ist mit dem, welches die Wundkontraktion bei Meerschweinchen verzögert, induziert eine Synthese von neuer Dermis innerhalb von 15 Tagen bei Patienten mit massiven Verbrennungen^[50]. Die neue Dermis bildet ein geeignetes Bett, auf das eine dünne Schicht der Epidermis des Patienten (die ohne größere Operation gewonnen werden kann) gepfflanzt und somit die Wunde permanent geschlossen wird (Abb. 17). Vor kurzem wurde eine Versuchsreihe mit 106 Patienten durchgeführt, die alle massive Verbrennungen erlitten hatten. Diese Versuchsreihe, an der elf Kliniken beteiligt waren, bestätigte die früheren Befunde^[50] und zeigte, daß die Behandlung mit ECM-Analoga zu Ergebnissen führt, die klinisch der Behandlung mit Autotransplantaten gleichwertig sind^[51]. Dies ist besonders interessant, wenn man bedenkt, daß die Dermis spontan nicht synthetisiert werden kann. Es ist sehr wahrscheinlich, daß auch andere Gewebe, die während der Wundheilung nicht spontan rege-

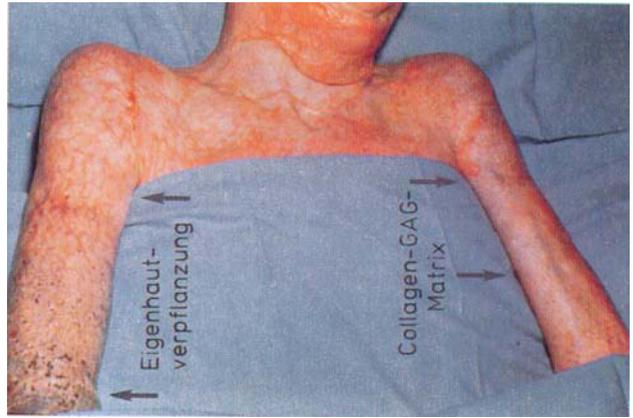


Abb. 17. Einem stark verbrannten Patienten wurden Eigenhaut (links) und eine Collagen-GAG-Matrix (rechts) transplantiert. Die ursprüngliche klinische Untersuchung an zehn Patienten durch Dr. John F. Burke et al. am Massachusetts General Hospital [50] wurde auf 106 Patienten ausgedehnt [51]. Beide Untersuchungen zeigten, daß eine Wundabdeckung aus einer oberen Schicht Silicongummi und einer unteren Schicht aktiver Collagen-GAG-Matrix („künstliche Dermis“, „künstliche Haut“) genauso gut wie eine Eigenhautverpflanzung ist. Beim chirurgischen Verfahren wird eine Collagen-GAG-Matrix verwendet, die nicht mit Zellen besät worden ist. Etwa 15 Tage nach Verpflanzung wird die Siliconschicht entfernt und gibt ein neues Wundbett frei, auf das dann ein dünnes Autoepidermistransplantat gebracht wird. Bei der konventionellen Eigenhautverpflanzung wird nicht nur die Epidermis, sondern auch eine Dermis, die etwa die halbe Dicke der Dermis des Patienten ausmacht, entfernt. Dieses Verfahren hinterläßt eine langsam heilende Donorstelle, die vernarbt; das Verfahren mit künstlicher Haut hinterläßt eine schnell heilende, fast unvernarbte Donorstelle (Photo von Dr. J. F. Burke).

nerieren, dazu angeregt werden können, wenn sie mit geeigneten ECM-Analoga behandelt werden.

Die ungewöhnliche biologische Aktivität bestimmter Collagen-GAG-Matrices beruht offenbar auf spezifischen Zell-Matrix-Wechselwirkungen, die auftreten, wenn die Matrices in Kontakt mit einem Wundbett der Haut oder mit abgeschnittenen Nervenenden treten. Welche Wechselwirkungen sind das? Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Hautwunden haben gezeigt, daß sich Zellen (Monozyten) besonders eng an eine Collagen-GAG-Oberfläche anlagern, die mit einer dünnen Schicht eines Fibrin-ähnlichen Netzwerks überzogen ist (Abb. 18 A, B)^[89]. Die angelagerten Zellen sind auf der Matrixoberfläche eng benachbart und wechselwirken höchstwahrscheinlich miteinander. Eine solche Zell-Matrix-Wechselwirkung wird bei normal heilenden Hautwunden nicht beobachtet (Abb. 18 C)^[89], obwohl lokal größere Mengen verschiedener Collagene, GAGs und anderer ECM-Komponenten vorhanden sind, die alle umgestaltet, d. h. abgebaut und neu synthetisiert, werden. Warum ist in Gegenwart von aktiven Matrices die Kontraktion verzögert oder vollständig gehemmt? Nach einer Hypothese^[90] verhindern die in den Abbildungen 18 A und 18 B gezeigten Zell-Matrix-Wechselwirkungen eine Differenzierung der Zellen des Wundbettes zu Myofibroblasten, also jenen Zellen, denen die Wundkontraktion während des normalen Heilungsprozesses zugeschrieben wird^[91]. Dieser Hypothese liegt die Beobachtung zugrunde, daß sich die Myofibroblastenzahl etwa am zehnten Tag nach Verletzung nur in solchen Wundbetten vermindert, die mit aktiven Matrices behandelt worden sind^[89, 90].

Am besten können die entscheidenden Eigenschaften einer Regenerationsmatrix verstanden werden, wenn man eine hochspezifische Zell-Matrix-Wechselwirkung annimmt, durch die der Mechanismus der Wundheilung von Kontrak-

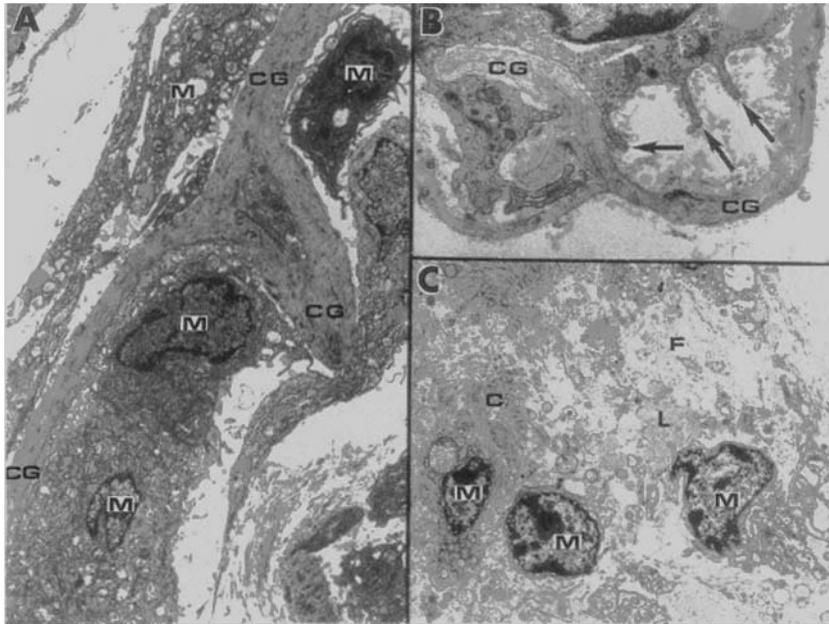


Abb. 18. Charakteristische Zell-Matrix-Wechselwirkungen, die auftreten, wenn eine aktive Collagen-GAG-Matrix mit dem Wundbett Kontakt hat. Wundmodell ist die tiefe Hautwunde beim Meerschweinchen. A, B: Sieben Tage nach der Transplantation einer Collagen-GAG-Matrix bilden mononucleare Zellen (M) eine anscheinend kontinuierliche Monozellschicht entlang der Porenoberfläche der Matrix. Die Pfeile in B zeigen Pseudopodien, die sich von den Zellen bis zur Matrixoberfläche erstrecken. C: Die unbehandelte Wunde zeigt eine zufällige Mischung von mononuclearen Zellen, Lipid (L), Fibrin (F) und Wirtscollagen (C). Vergrößerung A: 3000fach, B: 9500fach, C: 2000fach, CG: Collagen-graft-glycosaminoglycan-Copolymer (Photo von Dr. G. F. Murphy).

tion und Narbenbildung auf Kontraktionsabbruch und Geweberegeneration im Wundbett umgelenkt wird^[84]. Aus den quantitativen Beziehungen zwischen Matrixstruktur und Kinetik der Wundkontraktion (vgl. Abb. 11–13) können die physikalisch-chemischen Erfordernisse abgeleitet werden: Notwendig scheint die Anwesenheit einer Collagen-GAG-Oberfläche zu sein, die a) groß genug ist (obere Grenze des Porendurchmessers, vgl. Abb. 12), b) über einen Zeitraum von etwa zehn Tagen kaum wegdiffundiert (obere Grenze der Abbaugeschwindigkeit, vgl. Abb. 11) und c) über Poren verfügt, die groß genug für die in das Wundbett einwandernden Zellen sind (untere Grenze des Porendurchmessers; vgl. Abb. 12)^[84]. Weitere Kriterien, die gegenwärtig untersucht werden, scheinen eine Kristallinität von fast null (keine Bänderung, vgl. Abb. 6) und ein Volumenanteil der Poren von über 0.95 zu sein. Obwohl zur Hautregeneration die Matrix mit einer kritischen Zelldichte besät werden muß, kann die physikalisch-chemische Struktur allein auch schon die Wundkontraktion hinauszögern (vgl. Abb. 13, 16) und möglicherweise die Regeneration biologisch vorbereiten. Bei Untersuchungen zur Nervenregeneration ergab sich, daß eine Matrix, die nicht mit Zellen besät worden war, tatsächlich die Synthese von neuem funktionellem Gewebe über große Lücken hinweg induziert^[88, 92].

5. Zusammenfassung und Ausblick

Wir schließen, daß durch gut definierte physikalisch-chemische Manipulationen unlösliche, aber abbaubare, poröse, zellfreie makromolekulare Matrices mit einer bemerkenswerten biologischen Aktivität hergestellt werden können. Auch wenn diese Matrices nicht mit Zellen besät werden, verändern sie grundlegend den Verlauf der Heilung von Haut- und Nervenverletzungen. Diese Matrices sind sehr einfache chemische Analoga der ECM. Dennoch lassen sich die Struktur der Poren und des makromolekularen Netzwerks leicht innerhalb weiter Grenzen variieren. Mit diesen

gut definierten Matrices können wichtige Fragen über den Mechanismus der Gewebegestaltung beantwortet werden, der die normale Entwicklung oder Regeneration von der konventionellen Wundheilung unterscheidet. Solche Fragen waren bisher schwer zu beantworten, weil geeignete standardisierte Präparationen biologisch aktiver ECMs fehlten^[6].

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Collagen-GAG-Matrices, die die Grenzen der biologischen Aktivität im Hautwundenmodell bestimmen, sind sehr streng definiert (vgl. Abb. 11, 12), so daß im bestimmten Tiermodell wahrscheinlich nur eine einzige Substanz zur Hautregeneration in Frage kommt. Im Gegensatz zur großen Mehrheit der biologischen aktiven Substanzen ist die hier definierte Matrix unlöslich und kann nicht (wie lösliche Makromoleküle) durch ihr Molekulargewicht identifiziert werden. Ferner kann sie nicht röntgenkristallographisch charakterisiert werden, und sie ist hochporös und bildet keine homogene Phase. Die Collagen-GAG-Matrix bildet ein Netzwerk, das auch in Gegenwart von collagenolytischer Aktivität nicht wegdiffundiert und dessen Oberfläche groß genug ist, um eine Wechselwirkung mit einer großen Zahl von Zellen zu ermöglichen (vielleicht auch der Zellen untereinander). Wir haben daher auch vermutet, daß die Matrix bei der Hautentwicklung als unlöslicher Wachstumsfaktor^[84] fungiert. Anstatt zur Kontraktion des Wundbetts und zur Narbenbildung zu führen, induziert diese Matrix die Synthese von teilweise physiologischem Gewebe. Höchstwahrscheinlich wirkt diese Substanz also mitogen; sie sollte daher als Wachstumsfaktor betrachtet werden.

Übereinstimmung besteht darüber, daß eine bestimmte ECM, wahrscheinlich eine Variante oder ein Vorläufer der reifen Basallamina, die kritische Wechselwirkung zwischen Epithel- und Mesenchymzellen vermittelt, die zur Morphogenese einiger Gewebe während der Entwicklung führt^[4, 93]. Die durch die Daten in den Abbildungen 11–13 beschriebene, spezifische Matrix muß anwesend sein, damit die eingesäten Epithelzellen und die Mesenchymzellen, die aus dem darunterliegenden Wundbett einwandern, neue Haut bilden

können. Man kann daher spekulieren, daß die Collagen-GAG-Matrix diese kritische Zell-Zell-Wechselwirkung verursacht. Tatsächlich verläuft die Heilung ohne Anzeichen einer Regeneration, wenn nur Epithel- und Mesenchymzellen im Wundbett anwesend sind, aber keine Matrix^[94]. Diese Tatsache unterstützt die Hypothese, daß die hier beschriebene Regenerationsmatrix ein funktionelles Analogon der Basallamina ist. Dieses Analogon vermittelt eine kritische epithelial-mesenchymale Zellwechselwirkung während der Morphogenese von Haut und Nerv, bevor es vollständig abgebaut wird und vom Wundbett fortgediffundiert. Endprodukte der Hautmorphogenese sind nicht nur eine neue Dermis und Epidermis, sondern auch eine neue Basallamina (vgl. Abb. 1, 15A und 15B). Während dieses Vorgangs wird die Collagen-GAG-Matrix total abgebaut; sie kann elektronenmikroskopisch in neu synthetisierter Haut nicht nachgewiesen werden (Abb. 15B). Auch an den Regenerationsstellen des Ischiasnervs sind die Fragmente der Collagen-GAG-Matrix bald nicht mehr sichtbar.

Eine andere Interpretationsmöglichkeit ergibt sich aus der Tatsache, daß das gequollene, ungebänderte Typ-I-Collagen, das in der Regenerationsmatrix anwesend ist, nicht zur Aggregation von Blutplättchen führt, während das gebänderte Typ-I-Collagen sehr aktiv ist^[71]. Man weiß, daß Aggregation und Degranulation der Blutplättchen sofort nach Gewebeerletzung einsetzen, wobei der Blutplättchen-abhängige Wachstumsfaktor (PDGF) freigesetzt wird, ein starkes Mitogen aus Zellen mesenchymaler Herkunft, die an der normalen Wundheilung teilnehmen^[95, 96]. PDGF wird von Blutplättchen während der frühen Wundheilungsphase sekretiert; aber auch andere Zellen, hauptsächlich Makrophagen, synthetisieren diesen Wachstumsfaktor in den späteren Phasen der Wundheilung^[95, 96]. Da Blutplättchen durch die Regenerationsmatrix nicht aggregiert werden, wird wahrscheinlich kein PDGF in Wundbetten sekretiert, die mit der Matrix behandelt wurden; die stark proliferative Wirkung dieses Mitogens fehlt daher in solchen Wundbetten (zumindest in den frühen Stadien der Reaktion auf die Verletzung). Ich nehme an, daß die Abwesenheit von PDGF während der ersten Heilungsphase der kritische Faktor ist, der den Wundheilungsvorgang von der Kontraktion und der statistischen Zellteilung hin zu Kontraktionsverzögerung oder -hemmung verschiebt und die Organisation der Zellen so steuert, daß neue Haut und nicht Narbengewebe synthetisiert wird (Abb. 14, 15, 18).

Es ist interessant, über die strukturelle Ähnlichkeit zwischen der Basallamina und der Regenerationsmatrix nachzudenken. Typ-I-Collagen (vgl. Abb. 6), das wegen der Quellung im Lösungsmittel fast ganz ungebändert ist, scheint eine ähnliche fadenförmige Ultrastruktur (Quartärstruktur) in Form eines offenen Netzwerkes oder einer Leiter^[24, 25, 27] zu haben, wie sie für Typ-IV-Collagen in der Basallamina charakteristisch ist. Wie Typ-IV-Collagen in der Basallamina, aber anders als die Collagene Typ I, II und III bildet das gequollene Typ-I-Collagen – abgesehen von sehr wenigen Ausnahmen – keine Fibrillen. Auf der anderen Seite haben die Polypeptidketten in gequollenem, nicht gebändertem Collagen durchgehend die für Typ-I-Collagen charakteristische Tripelhelixstruktur (Tertiärstruktur), wohingegen die Polypeptidketten der Basallamina teilweise nicht helical vorliegen^[24, 25, 27]. Unterschiede existieren natürlich auch in der Aminosäurezusammensetzung der Collagene. Es wäre

hochinteressant, Collagen-GAG-Matrices zu synthetisieren, die auf Typ-IV-Collagen basieren und die auch Makromoleküle enthalten, die in der Basallamina vorkommen, wie Heparansulfat und Laminin. Es besteht kein Zweifel, daß eine derartige Synthese wichtige Beiträge zum Verständnis der Bedeutung der ECM während der Entwicklung liefern kann.

Die Regeneration des Ischiasnervs der Ratte wird von einer ähnlichen Collagen-GAG-Matrix induziert. Alles deutet darauf hin, daß das ECM-Analogon, welches die schnelle und vollständige Regeneration des Ischiasnervs induziert, schneller abgebaut wird und einen kleineren Porendurchmesser hat als das Analogon, das die Hautsynthese induziert^[81, 88, 92]. Es besteht die Möglichkeit, daß die Morphogenese jedes Gewebetyps oder Organs eine ganz spezifische ECM mit spezieller chemischer Zusammensetzung und physikalisch-chemischer Struktur erfordert. Diese Hypothese kann anhand neuer ECM-Analoga geprüft werden.

Damit ein sich entwickelndes System Gestalt annimmt, muß nicht nur eine aktiv differenzierende und proliferierende Zellpopulation vorhanden sein, sondern auch eine abbaubare extrazelluläre Matrix, die die Zellen räumlich ordnet und wahrscheinlich die Transkription von genetischer Information induziert. Für die Zukunft erwarte ich die Synthese von immer ausgeklügelteren, aber wohldefinierten makromolekularen Analoga verschiedener ECMs, mit deren Hilfe kritische Fragen der Entwicklung und Heilung beantwortet werden können.

Eingegangen am 28. Juni 1989 [A 745]
Übersetzt von Dr. Christiane Koszka, Berlin

- [1] K. A. Piez, A. H. Reddi (Hrsg.): *Extracellular Matrix Biochemistry*, Elsevier, New York 1984.
- [2] E. D. Hay (Hrsg.): *Cell Biology of Extracellular Matrix*, Plenum Press, New York 1981.
- [3] J. Darnell, H. Lodish, D. Baltimore: *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books, New York 1986.
- [4] W. F. Loomis: *Developmental Biology*, Macmillan, New York 1986.
- [5] R. L. Trestad (Hrsg.): *The Role of Extracellular Matrix in Development*, Alan R. Liss, New York 1984.
- [6] A. H. Reddi in [1], Kap. 10.
- [7] a) M. E. Nimni (Hrsg.): *Collagen*, CRC Press, Boca Raton 1988; b) [7a], Vol. 1, *Biochemistry*.
- [8] F. O. Schmitt, *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 14 (1985) 1.
- [9] H. C. Grillo, J. Gross, *J. Surg. Res.* 2 (1962) 69.
- [10] J. I. Abbenhaus, R. A. MacMahon, J. G. Rosenbrantz, B. C. Paton, *Surg. Forum* 16 (1965) 477.
- [11] M. Chvapil, R. Holusa, *J. Biomed. Mater. Res.* 2 (1968) 245.
- [12] A. L. Rubin, K. H. Stenzel in L. Stark, G. Agarwal (Hrsg.): *Biomaterials*, Plenum Press, New York 1969, S. 157–184.
- [13] I. V. Yannas, *Encycl. Polym. Sci. Eng.* 13 (1988) 317.
- [14] H. Wallace: *Vertebrate Limb Regeneration*, Wiley, New York 1981.
- [15] H. Roels in L. E. Glynn (Hrsg.): *Tissue Repair and Regeneration*, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam 1981, S. 265–270.
- [16] E. E. Peacock, Jr., in S. I. Schwartz, G. T. Shires, F. C. Spencer, E. H. Storer (Hrsg.): *Principles of Surgery*, 2. Auflage, McGraw-Hill, New York 1984, S. 289.
- [17] R. E. Billingham, P. B. Medawar, *J. Anat.* 89 (1955) 114.
- [18] R. E. Billingham, P. B. Medawar, *J. Exp. Biol.* 28 (1951) 385.
- [19] G. Lundborg, *Acta Orthop. Scand.* 58 (1987) 145.
- [20] G. Lundborg, L. B. Dahlin, N. Danielsen, R. H. Gelberman, F. M. Longo, H. L. Powell, S. Varon, *Exp. Neurol.* 76 (1982) 361.
- [21] W. Ring, I. Mita, A. D. Jenkins, N. M. Bikales, *Pure Appl. Chem.* 57 (1985) 1427.
- [22] I. V. Yannas, J. F. Burke, C. Huang, P. L. Gordon, *Polym. Prepr. Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.* 16 (1975) 209.
- [23] N. A. Kefalides, *Int. Rev. Connect. Tissue Res.* 6 (1973) 63.
- [24] J. H. Fessler, G. Lunstrum, K. G. Duncan, A. G. Campbell, R. Sterne, H. P. Bachinger, L. J. Fessler [5], S. 207–219.
- [25] E. J. Miller in [5], S. 139–156.

- [26] H. K. Kleinman, M. L. McGarvey, J. R. Hassell, G. R. Martin, A. B. von Evercooren, M. Dubois-Dalcq in [5], S. 123–143.
- [27] T. F. Linsenmayer, J. M. Fitch, R. Mayne in [5], S. 145–172.
- [28] M. B. Mathews: *Connective Tissue*, Springer, New York 1975.
- [29] B. P. Toole, D. A. Lowther, *Biochem. J.* 109 (1968) 857.
- [30] V. Podrazky, F. S. Steven, D. S. Jackson, J. B. Weiss, S. J. Leibovich, *Biochim. Biophys. Acta* 229 (1971) 690.
- [31] I. V. Yannas, A. V. Tobolsky, *Nature (London)* 215, (1967) 509.
- [32] I. V. Yannas, *Rev. Macromol. Chem. C7* (1972) 49.
- [33] J. Bello, H. Riese-Bello, *Sci. Ind. Photogr.* 29 (1958) 361.
- [34] F. H. Silver, *Ph. D. Dissertation*, Massachusetts Institute of Technology 1977.
- [35] F. H. Silver, I. V. Yannas, E. W. Salzman, *J. Biomed. Mater. Res.* 13 (1979) 701.
- [36] I. V. Yannas, A. V. Tobolsky, *J. Macromol. Chem.* 1 (1966) 723.
- [37] I. V. Yannas, A. V. Tobolsky, *Eur. Polym. J.* 4 (1968) 257.
- [38] N.-H. Sung, *Ph. D. Dissertation*, Massachusetts Institute of Technology, 1972.
- [39] J. H. Bowes, J. E. Taylor, *J. Am. Leather Chem. Assoc.* 66 (1971) 96.
- [40] P. J. Flory, R. R. Garrett, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 4836.
- [41] I. V. Yannas, J. F. Burke, P. L. Gordon, C. Huang, R. H. Rubenstein, *J. Biomed. Mater. Res.* 14 (1980) 107.
- [42] C. W. Cater, *J. Soc. Leather Trades Chem.* 47 (1963) 259.
- [43] J. H. Bowes, C. W. Cater, *J. Appl. Chem.* 14 (1964) 296.
- [44] D. Hopwood, in J. D. Bancroft, A. Stevens (Hrsg.): *Theory and Practice of Histological Techniques*, Churchill Livingstone, Edinburgh 1977, Kap. 2.
- [45] F. M. Richards, J. R. Knowles, *J. Mol. Biol.* 37 (1968) 231.
- [46] P. M. Hardy, A. C. Nicholls, H. N. Rydon, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1976, 958.
- [47] P. M. Hardy, G. J. Hughes, H. N. Rydon, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1976, 2282.
- [48] M. E. Nimni, D. T. Cheung, B. Strates, M. Kodama, K. Sheikh in [7a], *Vol. III, Biotechnology*, Kap. 1.
- [49] C. Huang, *Sc. D. Dissertation*, Massachusetts Institute of Technology, 1974.
- [50] J. F. Burke, I. V. Yannas, W. C. Quinby, Jr., C. C. Bondoc, W. K. Jung, *Ann. Surg.* 194 (1981) 413.
- [51] D. Heimbach, A. Luterman, J. Burke, A. Cram, D. Herndon, J. Hunt, M. Jordan, W. McManus, L. Solem, G. Warden, B. Zawacki, *Ann. Surg.* 208 (1988) 313.
- [52] L. R. G. Treloar: *The Physics of Rubber Elasticity*, 4. Auflage, Clarendon Press, Oxford 1975.
- [53] N. M. Wiederhorn, G. V. Reardon, *J. Polym. Sci.* 9 (1952) 4, 314.
- [54] A. Veis: *The Macromolecular Chemistry of Gelatin*, Academic Press, New York 1964.
- [55] P. J. Flory: *Principles of Polymer Chemistry*, Cornell University Press, Ithaca 1953.
- [56] P. J. Flory, J. Rehner, *J. Chem. Phys.* 11 (1943) 512.
- [57] J. E. Eastoe in G. N. Ramachandran (Hrsg.): *Treatise on Collagen, Vol. 1, Chemistry of Collagen*, Academic Press, London 1967, Kap. 1.
- [58] K. Linderström-Lang: *Lane Medical Lectures: Proteins and Enzymes*, Stanford University Press, Stanford, CA, 1952, S. 58.
- [59] W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.* 14 (1959) 1.
- [60] E. Baer, J. J. Cassidy, A. Hiltner in [7a], *Vol. II, Biochemistry and Biomechanics*, Kap. 9.
- [61] I. V. Yannas, C. Huang, *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.* 10 (1972) 577.
- [62] C. Huang, I. V. Yannas, *J. Biomed. Mater. Res. Symp.* 8 (1977) 137.
- [63] P. H. von Hippel, W. F. Harrington, *Biochim. Biophys. Acta* 36 (1959) 427.
- [64] P. L. Gordon, C. Huang, R. C. Lord, I. V. Yannas, *Macromolecules* 7 (1974) 954.
- [65] I. V. Yannas, N.-H. Sung, C. Huang, *J. Phys. Chem.* 72 (1976) 2935.
- [66] C. E. Hall, M. A. Jakus, F. O. Schmitt, *J. Am. Chem. Soc.* 64 (1942) 1234.
- [67] C. Wolpers, *Klin. Wochenschr.* 22 (1943) 624.
- [68] J. H. Highberger, J. Gross, F. O. Schmitt, *J. Am. Chem. Soc.* 72 (1950) 3321.
- [69] J. H. Highberger, J. Gross, F. O. Schmitt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 37 (1951) 286.
- [70] M. J. Forbes, *M.S. Dissertation*, Massachusetts Institute of Technology 1980.
- [71] M. Sylvester, I. V. Yannas, E. W. Salzman, *Thromb. Res.* 55 (1989) 135.
- [72] R. S. Bear, *J. Am. Chem. Soc.* 64 (1942) 727.
- [73] I. V. Yannas in P. Dineen (Hrsg.): *The Surgical Wound*, Lea & Febiger, Philadelphia 1981, Kap. 15.
- [74] N. Dagalakis, J. Flink, P. Stasikelis, J. F. Burke, I. V. Yannas, *J. Biomed. Mater. Res.* 14 (1980) 511.
- [75] E. E. Underwood: *Quantitative Stereology*, Addison-Wesley, Reading 1969.
- [76] H. F. Fischmeister in *Proc. Int. Symp. RILEM/IUPAC*, Prague 1973, Final Report Part II, S. C-439.
- [77] D. E. Wooley in [1], Kap. 4.
- [78] J. Gross, C. M. Lapiere, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48 (1962) 1014.
- [79] C. L. Mainardi, in J. Uitto, A. J. Perejda (Hrsg.): *Connective Tissue Disease*, Marcel Dekker, New York 1987.
- [80] I. V. Yannas, J. F. Burke, *J. Biomed. Mater. Res.* 14 (1980) 65.
- [81] I. V. Yannas, in [7a], *Vol. III, Biotechnology*, Kap. 4.
- [82] I. Mandl, J. D. MacLennan, E. L. Howes, *J. Clin. Invest.* 32 (1953) 1323.
- [83] I. V. Yannas, E. Lee, M. D. Bentz in C. G. Gebelein (Hrsg.): *Applied Bioactive Polymeric Materials*, Plenum, New York 1988, S. 313–318.
- [84] I. V. Yannas, E. Lee, D. P. Orgill, E. M. Skrabut, G. F. Murphy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 933.
- [85] I. V. Yannas, J. F. Burke, D. P. Orgill, E. M. Skrabut, *Science (Washington DC)* 215 (1982) 174.
- [86] A. Ferdman, I. V. Yannas, *Trans. Soc. Biomater.* 10 (1987) 207.
- [87] I. V. Yannas, D. P. Orgill, E. M. Skrabut, J. F. Burke in C. G. Gebelein (Hrsg.): *Polymeric Materials and Artificial Organs, ACS Symp. Ser. 256*, Am. Chem. Soc., Washington 1984, Kap. 13.
- [88] I. V. Yannas, D. P. Orgill, J. Silver, T. V. Norregaard, N. T. Zervas, W. C. Schoene in C. G. Gebelein (Hrsg.): *Advances in Biomedical Polymers*, Plenum, New York 1987, S. 1–9.
- [89] G. F. Murphy, D. P. Orgill, I. V. Yannas, *Lab. Invest.*, im Druck.
- [90] I. V. Yannas in G. Abatangelo, J. M. Davidson (Hrsg.): *Cutaneous Development, Aging and Repair, Fidia Research Series, Vol. 18*, Liviana Press, Padova 1989, S. 131.
- [91] G. Gabbiani, G. B. Ryan, G. Majno, *Experientia* 27 (1971) 549.
- [92] I. V. Yannas, C. Krarup, A. Chang, T. V. Norregaard, N. T. Zervas, R. Sethi, *Soc. Neurosci. Abstr.* 13 (1987) 1043.
- [93] E. D. Hay in [2], Kap. 12.
- [94] K. Troxel, I. V. Yannas, unveröffentlicht.
- [95] R. Ross, *Cell* 46 (1986) 155.
- [96] S. E. Lynch, J. C. Nixon, R. B. Colvin, H. N. Antoniades, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 7696.
- [97] Vgl. [3], Kap. 5, Abb. 5.52.
- [98] J. A. Chapman, D. J. S. Hulmes in A. Ruggeri, P. M. Motta (Hrsg.): *Ultrastructure of the Connective Tissue Matrix*, Martinus Nijhoff, Boston 1984, Kap. 1, Abb. 1.
- [99] K. A. Piez in [1], Kap. 1, Abb. 1.6.
- [100] K. A. Piez in [1], Kap. 1, Abb. 1.22.
- [101] M. E. Nimni, R. D. Harkness in [7], Kap. 1, Abb. 10.